

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004年7月1日 (01.07.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/055188 A1(51) 国際特許分類⁷: C12N 15/31, C12Q 1/68

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/015889

(22) 国際出願日: 2003年12月11日 (11.12.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2002-362878
2002年12月13日 (13.12.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社ニチレイ (NICHIREI CORPORATION) [JP/JP];

〒104-8402 東京都中央区築地6丁目19番20号 Tokyo (JP).

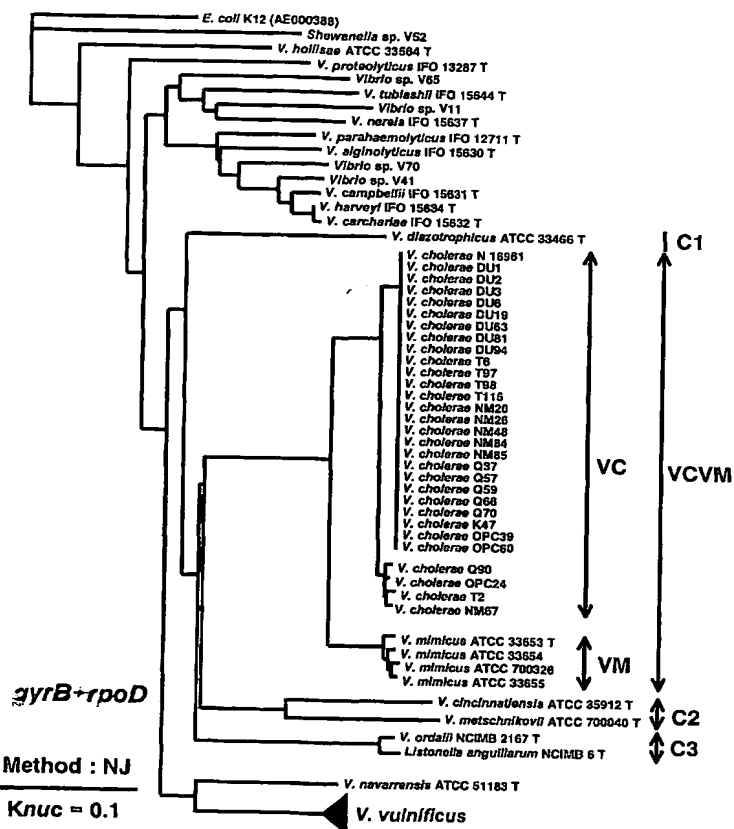
(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 小泉 雄史 (KOIZUMI, Takeshi) [JP/JP]; 〒261-8545 千葉県千葉市美浜区新港9番地 株式会社ニチレイ 研究開発部内 Chiba (JP). 西山 葉子 (NISHIYAMA, Yoko) [JP/JP]; 〒261-8545 千葉県千葉市美浜区新港9番地 株式会社ニチレイ 研究開発部内 Chiba (JP). 山本 敏 (YAMAMOTO, Satoshi) [JP/JP]; 〒261-8545 千葉県千葉市美浜区新港9番地 株式会社ニチレイ 研究開発部内 Chiba (JP). 福山 正文 (FUKUYAMA, Masafumi) [JP/JP]; 〒229-8501 神奈川県相模原市茅野辺1-17-71 麻布大学環境保健学部内 Kanagawa (JP). 古畑 勝則 (FURUHATA, Katsunori) [JP/JP]; 〒229-8501 神奈川県相模原市茅野辺1-17-71 麻布大学環境保健学部

[続葉有]

(54) Title: PRIMER AND PROBE FOR DETECTING *VIBRIO CHOLERAE* OR *VIBRIO MIMICUS* AND DETECTION METHOD USING THE SAME

(54) 発明の名称: ビブリオコレラ又はビブリオミミカスの検出用プライマー及びプローブ並びにそれらを用いる検出方法



(57) Abstract: It is intended to construct a specific gene amplification primer with high performance for detecting, quantifying and identifying *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus* which has a practically sufficient amplification efficiency and amplification specificity with little risk of misjudgment. Partial base sequences of *rpoD* genes and *gyrB* genes of *Vibrio cholerae*, *Vibrio mimicus* and species closely related thereto are determined and the genetic relationships among them are clarified. Then bases respectively specific to *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus* are identified. Thus, it becomes possible to design a highly specific probe containing the same and a gene amplification primer having a high specificity and an excellent amplification efficiency.

(57) 要約: 誤判定の可能性が低く、かつ実用上十分な増幅効率と増幅特異性を有する、高性能なビブリオコレラ及びビブリオミミカス検出・定量・同定用特異遺伝子増幅プライマーを作製すること。本発明者等は、ビブリオコレラ及びビブリオミミカスとその近縁種の $rpoD$ 遺伝子および $gyrB$ 遺伝子の部分塩基配列を決め、その系統関係を明らかにし、ビブリオコレラ及びビブリオミミカスそれぞれに特徴的な塩基を同定し、これを含む高特異性を有するプローブ、及び高特異性を有しかつ増幅効率に優れた遺伝子増幅用プライマーを設計することを可能とした。



内 Kanagawa (JP). 大仲 賢二 (OONAKA, Kenji) [JP/JP];
〒229-8501 神奈川県 相模原市 瀬野辺1-17-71 麻布大
学 環境保健学部内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 平木 祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒
105-0001 東京都 港区 虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5
森ビル 3階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE,
DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (BW, GH, GM, KE, LS,
MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特
許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッ
パ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

ビブリオコレラ又はビブリオミミカスの検出用プライマー及びプローブ
並びにそれらを用いる検出方法

技術分野

本発明は、食品検査、疫学的環境検査、並びに臨床検査における、ビブリオコレラ及びビブリオミミカスの検出・同定・計数方法に関するものである。

背景技術

ビブリオコレラは経口感染の後、コレラ毒素を産生し、激しい下痢と嘔吐を引き起こす。場合によっては、極度の脱水症状のため、死亡することもある感染症細菌である。ヒトに対し毒性を示すビブリオコレラは抗 01 抗体で凝集する 01 コレラのみであり、それ以外の菌は 01 非凝集(01-non-agglutinable)ということで NAG(ナグ)-ビブリオと分類され、人に対する毒性を示さないとされてきた。しかし、1995 年にインドのベンガル地方で、それまでのコレラと同じ様な症状を起こす 01 抗原を持たない新型のビブリオコレラが分離され、0139 という新しい 0 抗原を持つことが明らかとなった。この株は、ベンガル株と呼ばれ、従来の 01 コレラと同様のコレラ毒素産生遺伝子を持ち、毒素を産生して、コレラ症を惹起することが明らかにされた。このことにより、01 コレラ以外でもヒトに感染しコレラ症の原因となり得ることが示された。実際、01、0139 以外のビブリオコレラにもコレラ毒素遺伝子を有する株が存在し、ヒトに対してコレラ症を引き起こす。しかしながら、01 および 0139 以外のビブリオコレラによる症状は行政上感染症として取り扱われない。

一方で、ビブリオコレラの非 01 株の中に白糖非分解の株がまれに検出されていたが、Davis らが、ビブリオコレラとの DNA 相同性を調べることで、ビブリオコレラとはやや異なることを示しビブリオミミカスとした。このビブリオミミカスはビブリオコレラと非常に近い種であり、生化学的性状では白糖分解能が異なる(ビブリオコレラが陽性、ビブリオミミカスが陰性)が、それ以外の性状は非常

に似ていると報告されている (J. Clin. Microbiol. 14, 631-639 1981) (非特許文献 1)。ビブリオミミカスにはビブリオコレラと同様のコレラ毒素遺伝子を有する株が存在することが知られており (Microbiol Immunol 1998; 42 823-828) (非特許文献 2)、コレラ症と同様の症状を引き起こす可能性がある。

他方、コレラ毒素遺伝子を持たないビブリオコレラの中に、腸炎ビブリオの病原因子である耐熱性溶血毒素遺伝子 (tdh) を持つ株 (Appl Environ Microbiol 52:1218-20, 1986) (非特許文献 3) や、大腸菌の耐熱性エンテロトキシンを産生する株 (J. Clin. Invest. 85:697-705, 1990) (非特許文献 4) の存在が報告されており、下痢症などの原因となり得る。さらに、ビブリオミミカスにも同様に tdh 遺伝子を有する株が存在することが知られており (FEMS Microbiol 59:319-23, 1990) (非特許文献 5) コレラ毒素を産生しない場合にも下痢症などの原因となり得る。

上述の如く、血清型が 01 及び 0139 (ベンガル) であり、コレラ毒素を産生するビブリオコレラが検出された場合には、“感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律” の定める措置の対象となる。さらに、01 コレラ及びベンガルコレラ以外のビブリオコレラにもコレラ毒素産生株が存在し、コレラ症と同様の症状を引き起こす。他方に、コレラ毒素非産生株であっても、コレラ症の原因とは成り得ないが、そのことが非病原性であることを意味するわけではなく、コレラ毒素以外の毒素を産生することにより急性胃腸炎、下痢症などを惹起する。従って、ビブリオコレラ菌群を迅速かつ正確に検出することが求められる。

一方で、ビブリオミミカスにおいても、コレラ症の原因となり得るコレラ毒素を産生する株及びコレラ毒素以外の毒素を産生することにより急性胃腸炎、下痢症などの原因となり得る。故に、ビブリオミミカス菌群を迅速かつ正確に検出することも求められる。

生化学的手法を用いた従来の検査方法は、熟練した技術と多大な労力と時間を必要とする。この欠点を補うために、正確かつ迅速・簡便なビブリオコレラおよびビブリオミミカスの検出・同定を目的とした遺伝子による検査方法が試みられている。

コレラ症の原因であるコレラ毒素をコードする遺伝子を検出するプライマーが

既に存在する (J. Biol. Chem. 1983; 258, 13722-13726) (非特許文献 6)。しかしながら、当該プライマーでは、コレラ毒素遺伝子を有せずに別の毒素を産生するビブリオコレラ及びビブリオミミカスを検出することは出来ない。

一方、ビブリオコレラとビブリオミミカスの 16S rRNA 遺伝子塩基配列を全長で比較すると、1,456 塩基のうち 6 塩基しか異ならない (Int. J. Syst. Bacteriol. 44, 416-426 1994) (非特許文献 7) ために、明確に区別することは不可能であることから、ビブリオコレラとビブリオミミカスの 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Region を比較し、ビブリオコレラとビブリオミミカスが分類可能であることを示し、ビブリオコレラのみを検出可能なプライマーを作成した報告 (Appl. Environ. Microbiol. 65, 2202-2208 1999) (非特許文献 8) も存在しているが、当該プライマーを用いた場合に、ビブリオミミカスを誤って検出してしまうとの報告も存在する (Appl. Environ. Microbiol. 67, 2360-2364 2001) (非特許文献 9)。

発明の開示

以上の様に、既存の遺伝子検出方法では、ビブリオコレラ及びビブリオミミカスを精度よく検出することができない。

従来の遺伝子検査方法に共通しているのは、細菌の「種」が遺伝的な多様性を内包する集団である事を無視している点に有る。ある細菌集団のメンバーと推測される 1 菌株の塩基配列を、その集団共通の、あるいは代表する配列として用いる事は、中立的変異を速やかに蓄積する遺伝子の分子進化の性質上大変危険である。即ち、本来検出されるべき菌株がプライマー領域の僅かな変異の為に増幅が阻害されて検出されなかったり、プライマーの特異性が十分でないために検出されるべきでない近縁株が検出されるといった誤判定の原因になる事が危惧される。そこで、特異性のバックグラウンドが証明されており、誤判定の可能性が低く、かつ実用上十分な増幅効率と増幅特異性を有する、高性能なビブリオコレラおよびビブリオミミカスの検出・同定・定量用特異遺伝子増幅プライマー、さらにビブリオコレラ、ビブリオミミカスをそれぞれ特異的に検出・同定・定量する遺伝子増幅プライマーの作成が必要とされていた。

細菌のある系統群の遺伝子の特異的に検出する方法を作成する為には、検出し

ようとする生物群、ならびにその系統的に近縁な生物群の塩基配列をなるべく多数収集する必要がある。また、特異検出のターゲットとする遺伝子は、最も近縁の生物とも判別可能なように、十分に異なる塩基配列を有している必要がある。この為には、十分に早い進化速度を有していなくてはならない。また、高頻度に水平伝播する遺伝子（たとえば腸炎ビブリオの毒素遺伝子）の様に、系統とは無関係に存在する遺伝子は用いる事が出来ない。本発明でターゲットとして用いた *gyrB* 遺伝子及び *rpoD* 遺伝子がコードするタンパク質は、生存に必須なタンパク質である。この為、水平伝播し難く、また適度な進化速度を有しているため、細菌の系統解析に適している（Int. J. Syst. Bacteriol. 1998;48, 813-819, Int. J. Syst. Bacteriol. 1999;49, 87-95）。発明者らは、既に *gyrB* 遺伝子及び *rpoD* 遺伝子の PCR ダイレクトシーケンス法による簡便な塩基配列の決定方法を開発している（特開平 07-213229、特開平 08-256798）。さらに、発明者らは、既に多数のビブリオコレラを単離しており、他方に、公知のビブリオミミカス保存株及び、16S rRNA 配列に基づく解析により本菌に近縁であることが報告されている *Listonella anguillarum*, *V. ordalii*, *V. diazotrophicus*, *V. vulnificus*, *V. navarrensis*, *V. metschnikovii*, *V. cincinnatiensis*（International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 51, 1449-1456(2001)）について、表 1 に示される菌株の *gyrB* および *rpoD* 遺伝子の部分塩基配列を解析し、その配列に基づいた分子系統解析を行い、その系統関係を明らかにした。

表 1

表1. 使用した菌株			
<i>V. Cholerae</i>	29株	臨床分離株	29株
<i>V. mimicus</i>	4株	ATCC 33653 T	
		ATCC 33654	
		ATCC 33655	
		ATCC 700326	
その他のビブリオ属保存株	52株		
<i>V. Vulnificus</i> 32株		ATCC 27562 T	
		ATCC 29306	
		ATCC 29307	
		ATCC 33147	
		ATCC 33148	
		ATCC 33149	
		ATCC 33814	
		ATCC 33815	
		ATCC 33816	
		ATCC 33817	
		ATCC 43382	
		ATCC BAA-86	
		ATCC BAA-87	
		ATCC BAA-88	
		ATCC BAA-89	
		ATCC BAA-90	
		JCM 3726	
		JCM 3727	
		JCM 3728	
		JCM 3729	
		JCM 3730	
		JCM 3731	
		環境分離株	10株
<i>V. diazotrophicus</i>		ATCC 33466 T	
<i>V. navarrensis</i>		ATCC 51183 T	
<i>V. metschnikovii</i>		ATCC 700040 T	
<i>V. cincinnatiensis</i>		ATCC 35912 T	
<i>V. ordalii</i>		NCIMB 2167 T	
<i>Listonella anguillarum</i>		NCIMB 6 T	
<i>V. hollisae</i>		ATCC 33564 T	
<i>V. alginolyticus</i>		IFO 15630 T	
<i>V. campbellii</i>		IFO 15631 T	
<i>V. carchariae</i>		IFO 15632 T	
<i>V. harveyi</i>		IFO 15634 T	
<i>V. nereis</i>		IFO 15637 T	
<i>V. parahaemolyticus</i>		IFO 12711 T	
<i>V. proteolyticus</i>		IFO 13287 T	
<i>V. tubiashii</i>		IFO 15644 T	
<i>Vibrio. sp</i>	5株	食品由来分離株	
合計85株			

即ち、供試菌株を 2%NaCl 添加ブレインハートインフュージョン培地で増菌培養した後に、PUREGENE DNA Isolation Kit(Gentra SYSTEMS)を用いて染色体 DNA

を抽出した。抽出した DNA を鋳型として、*gyrB* 増幅ユニバーサルプライマー UP-1 E および AprU を用いて約 900bp (大腸菌 K-12 株上の塩基配列上のポジション 331-1212 ; アミノ酸配列ではポジション 111 から 404 に相当する領域) の *gyrB* 遺伝子断片を PCR 増幅した。また同様に *rpoD* 増幅ユニバーサルプライマー 70F-M13 および 70R-M13 を用いて約 800bp (大腸菌 K-12 株上の塩基配列上のポジション 334-1125 ; アミノ酸配列ではポジション 112 から 375 に相当する領域) の *rpoD* 遺伝子断片を PCR 増幅した。得られた PCR 産物は、1% アガロースゲルで電気泳動後、臭化エチジウムで染色し紫外線照射下でその存在を確認した後に Wizard PCR Preps DNA Purification System(Promega)を用いて精製しシーケンス反応の鋳型とした。シーケンス反応は、ユニバーサルプライマーに予め付加してある M13R、M13-21 配列をプライマーとして用い ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit(PE Applied Biosystems)を用いてサイクルシーケンス反応を行い、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer(PE Applied Biosystems)にて配列を解析した。決定した塩基配列を用いて分子系統解析を行うにあたり、ビブリオコレラおよびミミカスの近傍をより正確に把握することを目的として、*gyrB* および *rpoD* 遺伝子部分配列を結合させ解析を実施した。得られた塩基配列を、CLUSTAL W コンピュータープログラムで多重アラインメント解析を行った後、PHYLIP コンピュータープログラムパッケージを用い、木村の 2 パラメーターモデルで算出した遺伝的距離に基づいて近隣結合法により分子系統樹を作成した。この結果、ビブリオコレラ及びミミカスが他のビブリオ属細菌とは異なった単一の系統に属することが明らかとなった。さらに、ビブリオコレラ及びミミカスもそれぞれが独立した系統群を形成していることが示された。(図 1) そこで、ビブリオコレラ及びミミカス菌群のみを検出可能な遺伝子検査法を確立するために、まず、近縁種間の塩基配列の差異を明らかとした。即ち、ビブリオコレラ及びミミカス群内では保存され、他のビブリオ属細菌とは異なっている塩基の位置を同定した。具体的には、ビブリオコレラ及びミミカスが属する系統群のコンセンサス配列を求めると共に、分子系統解析の結果から本系統に近縁であることが判明した図 1 中 C1~C3 の系統のコンセンサス配列を比較し、系統特異的情報図を作成した(図 2、3)。図 2 より、*gyrB* 遺伝子においては、配列表中の配列番号 1 の位置番号 (以

下塩基番号とも言う) 21、96、107、126、153、190、258、270、279、285、357、543、552、557、600、690、702、714、729、733、734、759、771、782、786、792、795 又は 885 の位置、図 3 より、*rpoD* 遺伝子においては配列表中の配列番号 2 の位置番号 3、27、66、67、75、90、117、123、141、144、177、178、180、186、223、227、228、231、250、251、255、257、259、264、300、301、302、303、305、313、314、350、351、362、369、373、374、380、390、400、402、409、410、415、416、423、427、433、444、447、504、510、513、543、556、558、618、638、649、663、685、711、747、757、762、763、又は 789 の位置がビブリオコレラ及びミミカスに属する系統に特異的であることが明らかとなった。これら特徴的塩基を含む本系統に特異的な配列を用いることにより、高特異性を有するプローブ及び高特異性を有しかつ増幅効率に優れた遺伝子増幅プライマーを設計することが可能となる。例えば、近縁種と塩基が相違する位置を必ず含むように、当該近縁種と相違する塩基を含む連続する 15 塩基以上の *gyrB* 及び *rpoD* 遺伝子の塩基配列、好適には 20 塩基以上、更に好適には 20 塩基以上 40 塩基以下の連続する *gyrB* および *rpoD* 遺伝子の塩基配列を含むプライマーを設計することが可能となる。同様に、近縁種と塩基が相違する位置を必ず含むように、当該近縁種と相違する塩基を含む連続する 15 塩基以上の *gyrB* および *rpoD* 遺伝子の塩基配列、好適には 20 塩基以上、更に好適には 20 塩基以上で 100 塩基以下の連続する *gyrB* および *rpoD* 遺伝子の塩基配列を含むようにプローブを設計することが可能となる。さらに、当該プライマー及びプローブの作成には、上記相違塩基を 2 以上の高頻度で含む領域、例えば、*gyrB* 遺伝子においては、96、107 を含む領域、258、270、279、285 のいずれかの位置を 2 以上含む領域、543、552、557 のいずれかの位置を 2 以上含む領域、690、702、714 のいずれかの位置を 2 以上含む領域、729、733、734 のいずれかの位置を 2 以上含む領域、759、771 を含む領域、782、786、792、795 のいずれかの位置を 2 以上含む領域、*rpoD* 遺伝子においては、66、67、75、90 のいずれかの位置を 2 以上含む領域、177、178、180、186 のいずれかの位置を 2 以上含む領域、223、227、228、231 のいずれかの位置を 2 以上含む領域、250、251、255、257、259、264 のいずれかの位置を 2 以上含む領域、300、301、302、303、305、313、314 のいずれかの位置を 2 以上含む領域、362、369、373、374、

380 のいずれかの位置を 2 以上含む領域、400、402、409、410、415、416 のいずれかの位置を 2 以上含む領域、423、427、433、444、447 のいずれかの位置を 2 以上含む領域、504、510、513 のいずれかの位置を 2 以上含む領域、543、556、558 のいずれかの位置を 2 以上含む領域、747、757、762、763 のいずれかの位置を 2 以上含む領域が好適に使用できる。また、プライマーの場合、3'末端がビブリオコレラ及びミミカス菌群に特異的な塩基であることが望ましい。本件発明は、これらプライマー及びプローブを他の試薬と組み合わせたビブリオコレラおよびミミカスの検出、定量又は同定用のキットを包含するものである。

他方、ビブリオコレラ及びミミカス菌群はさらに、ビブリオコレラ菌群とビブリオミミカス菌群が独立した系統を形成した（図 1）ことから、ビブリオコレラ及びミミカス菌群をそれぞれ検出可能な遺伝子検査法を確立するために、先と同様に、ビブリオコレラ及びミミカス群内でそれぞれ保存された領域、及び互いに異なっている塩基の位置を同定した。具体的には、ビブリオコレラ及びミミカスが属する各系統群のコンセンサス配列を、互いに比較することで系統特異的情報図を作成した（図 4、5、6、7）。ビブリオコレラが属する系統においては、*gyrB* 遺伝子の場合、図 4 より、配列表中の配列番号 3 の位置番号 15、36、39、42、45、48、51、90、111、133、226、285、291、306、330、384、390、399、507、708、756、837、867、873、879、882、又は 885 の位置、*rpoD* 遺伝子においては図 5 より配列表中の配列番号 4 の位置番号 12、93、96、105、114、115、116、117、126、132、141、156、198、201、216、222、231、240、252、254、255、260、261、264、276、285、291、327、333、342、345、424、426、432、441、445、446、448、450、453、468、489、495、501、519、522、525、540、549、570、585、591、600、603、606、639、645、654、657、666、675、679、680、681、687、702、705、708、714、720、723、729、732、741、750、765、768、795 又は 804 の位置が特異的であることが明らかとなった。また、ビブリオミミカスが属する系統においては、*gyrB* 遺伝子の場合、図 6 より、配列表中の配列番号 5 の位置番号 15、36、39、42、45、48、51、90、111、133、226、285、291、306、330、384、390、399、507、708、756、837、867、873、879、882、又は 885 の位置、*rpoD* 遺伝子においては、図 7 より、配列表中の配列番号 6 の位置番号 12、93、96、105、114、115、

116、117、126、132、141、156、198、201、216、222、231、240、252、254、255、260、261、264、276、285、291、327、333、342、345、424、426、432、441、445、446、448、450、453、468、489、495、501、519、522、525、540、549、570、585、591、600、603、606、639、645、654、657、666、675、679、680、681、687、702、705、708、714、720、723、729、732、741、750、765、768、795又は804の位置が特異的であることが明らかとなった。これら特徴的塩基を含むビブリオコレラ又はビブリオミミカスが属する系統に特異的な配列を用いることにより、高特異性を有するプローブ及び高特異性を有しかつ増幅効率に優れた遺伝子増幅プライマーを設計することが可能となる。例えば、ビブリオコレラとビブリオミミカスの塩基が相違する位置を必ず含むように、当該2菌種が相違する塩基を含む連続する15塩基以上の *gyrB* および *rpoD* 遺伝子の塩基配列、好適には20塩基以上、更に好適には20塩基以上40塩基以下の連続する *gyrB* および *rpoD* 遺伝子の塩基配列を含むプライマーを設計することが可能となる。同様に、ビブリオミミカスとビブリオコレラの塩基が相違する位置を必ず含むように、当該2菌種が相違する塩基を含む連続する15塩基以上の *gyrB* および *rpoD* 遺伝子の塩基配列、好適には20塩基以上、更に好適には20塩基以上で100塩基以下の連続する *gyrB* および *rpoD* 遺伝子の塩基配列を含むプローブを設計することが可能となる。さらに、当該プライマー及びプローブの作成には、上記相違塩基を2以上の高頻度で含む領域、例えば、*gyrB* 遺伝子においては、36、39、42、45、48、51のいずれかの位置を2以上含む領域、285、291、306のいずれかの位置を2以上含む領域、384、390、399のいずれかの位置を2以上含む領域、867、873、879、882、885のいずれかの位置を2以上含む領域、*rpoD* 遺伝子においては、93、96、105、114、115、116、117のいずれかの位置を2以上含む領域、126、132、141のいずれかの位置を2以上含む領域、216、222、231、240のいずれかの位置を2以上含む領域、252、254、255、260、261、264のいずれかの位置を2以上含む領域、276、285、291のいずれかの位置を2以上含む領域、327、333、342、345のいずれかの位置を2以上含む領域、424、426、432、441、445、446のいずれかの位置を2以上含む領域、448、450、453、468のいずれかの位置を2以上含む領域、489、495、501のいずれかの位置を2以上含む領域、519、522、525、540のいずれかの位置

を2以上含む領域、585、591、600、603、606のいずれかの位置を2以上含む領域、639、645、654、657のいずれかの位置を2以上含む領域、666、675、679、680、681、687のいずれかの位置を2以上含む領域、702、705、708、714、720、723のいずれかの位置を2以上含む領域、729、732、741、750のいずれかの位置を2以上含む領域が好適に使用できる。また、プライマーの場合、3'末端がビブリオコレラ又はビブリオミミカスに特異的な塩基であることが望ましい。

具体的には、ビブリオコレラ及びミミカス菌群を検出、定量又は同定用のプライマーとしては、

(1) *gyrB* 遺伝子については、配列番号1の位置番号96、107の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号1の位置番号258、270、279、285のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、配列番号1の位置番号543、552、557のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、配列番号1の位置番号690、702、714のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、配列番号1の位置番号729、733、734のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号1の位置番号759、771の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号1の位置番号782、786、792、795のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマーが挙げられる。より具体的には、5'-tycaywscsaaacttacca-3' 又は対応する相補鎖、5'-gaaytctggcgtgtcgatcaag-3' 又は対応する相補鎖、5'-catrtagttgttcaaagtacgg-3' 又は対応する相補鎖、5'-ggatttyacytccgaagaaacyagc-3' 又は対応する相補鎖、5'-ygccagcttctcattcatr-3' 又は対応する相補鎖、5'-cgcttcgcttggttttcc-3' 又は対応する相補鎖、及び5'-caataatcttcgaacaaacgt-3' 又は対応する相補鎖のいずれかである遺伝子増幅プライマー、並びに上記配列からなる鎖又は相補鎖を含む遺伝子増幅プライマーが挙げられる。

(2) *rpoD* 遺伝子については、配列番号2の位置番号66、67、75、90のいずれ

か2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号2の位置番号177、178、180、186のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号2の位置番号223、227、228、231のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号2の位置番号250、251、255、257、259、264のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号2の位置番号300、301、302、303、305、313、314のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号2の位置番号362、369、373、374、380のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号2の位置番号400、402、409、410、415、416のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号2の位置番号423、427、433、444、447のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号2の位置番号504、510、513のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号2の位置番号543、556、558のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、又は配列番号2の位置番号747、757、762、763のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマーが挙げられる。より具体的には、5'-gattgctgagtatcctggaaccatc-3'又は対応する相補鎖、5'-gaycctaacgacatggaaacc-3'又は対応する相補鎖、5'-ttcwg arctytctgaagcs-3'又は対応する相補鎖、5'-agatgaygmkgctcgysgar-3'又は対応する相補鎖、5'-cgacggtgaaagyagcgacag-3'又は対応する相補鎖、5'-caatgaa ctgcgcggyaagtt-3'又は対応する相補鎖、5'-gtcacgaccaaattcattaac-3'又は対応する相補鎖、5'-gyytgamgcttcagawgcttgrtka-3'又は対応する相補鎖、5'-y grrgttcgcagagtttcaacc-3'又は対応する相補鎖、5'-catyaccaarcgytcttgg-3'又は対応する相補鎖、及び5'-cgytcaacagacagtgaawgtc-3'又は対応する相補鎖

のいずれかである遺伝子増幅プライマー、並びに上記配列からなる鎖又は相補鎖を含む遺伝子増幅プライマーが挙げられる。

ビブリオコレラ用プライマーとしては、

(1) *gyrB* については、配列番号 3 の位置番号 36、39、42、45、48、51 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号 3 の位置番号 285、291、306 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号 3 の位置番号 384、390、399 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号 3 の位置番号 867、873、879、882、885 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマーが挙げられる。より具体的には、5'-ggtggttaacgcgctytct-3' 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5'-ycgatgaacgtgaagaagataaa-3' 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5'-tgagaaagtcttccacttt-3' 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5'-gttaaagtgaagactttc-3' 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、及び 5'-gggtaagccwgcaagatcc-3' 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、並びに上記配列からなる鎖又は相補鎖を含む遺伝子増幅プライマーが挙げられる。

(2) *rpoD* については、配列番号 4 の位置番号 93、96、105、114、115、116、117、のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号 4 の位置番号 126、132、141 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号 4 の位置番号 216、222、231、240 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号 4 の位置番号 252、254、255、260、261、264 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号 4 の位置番号 276、285、291 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号 4 の位置番号 327、333、342、345 のいずれか 2 以上の位置の

塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号 4 の位置番号 424、426、432、441、445、446 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号 4 の位置番号 448、450、453、468 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号 4 の位置番号 489、495、501 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号 4 の位置番号 519、522、525、540 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号 4 の位置番号 585、591、600、603、606 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号 4 の位置番号 639、645、654、657 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号 4 の位置番号 679、680、681、687、702 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号 4 の位置番号 705、708、714、720、723 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号 4 の位置番号 729、732、741、750 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、が挙げられる。より具体的には、5 ‘-attcttgagcagtttgatcgt-3’ 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5 ‘-caggccgaagagctacgtctc-3’ 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5 ‘-tgagctttctgaagcggatctcgcg-3’ 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5 ‘-gaagatgatgctgtcgtcgaa-3’ 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5 ‘-gaagatgaagacgaagat-3’ 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5 ‘-cggtatcgaccctgaactg-3’ 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5 ‘-catcaagcttctgaagcgtcaga-3’ 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5 ‘-tcaaccaagtggctgaattgc-3’ 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5 ‘-acggaagatatccarcactaa-3’ 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5 ‘-gcgaacacgatccattgaagtg-3’ 又は

対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5 ‘-gatgaacgatttcttcggcatc-3’
 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5 ‘-aaggactttatccagccac-3’
 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5 ‘-ttcttcttgctcacgga
 ctttcgc-3’ 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5 ‘-ttctgaatt
 gaacggcggatc-3’ 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、及び5 ‘-
 tgtctcttgctcgatcatttgt-3’ 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、
 並びに上記配列からなる鎖又は相補鎖を含む遺伝子増幅プライマーが挙げられる。

ビブリオミミカス用プライマーとしては、

(1) gyrB については、配列番号5の位置番号36、39、42、45、48、51のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号5の位置番号285、291、306のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号5の位置番号384、390、399のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号5の位置番号867、873、879、882、885のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマーが挙げられる。より具体的には、5 ‘-ggtagtgaatgccctgtca-3’ 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5 ‘-cggatgagcgtgaagaagataag-3’ 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5 ‘-tgaaaaagtattccacttc-3’ 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5 ‘-gttgaagtgaatactttt-3’ 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、及び5 ‘-wggcaaaccagckarrtct-3’ 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、並びに上記配列からなる鎖又は相補鎖を含む遺伝子増幅プライマーが挙げられる。

(2) rpoD については、配列番号6の位置番号93、96、105、114、115、116、117、のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号6の位置番号126、132、141のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号6の位置番号216、222、231、240のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子

増幅プライマー、配列番号 6 の位置番号 252、254、255、260、261、264 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号 6 の位置番号 276、285、291 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号 6 の位置番号 327、333、342、345 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー。配列番号 6 の位置番号 424、426、432、441、445、446 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号 6 の位置番号 448、450、453、468 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号 6 の位置番号 489、495、501 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、位置番号 519、522、525、540 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号 6 の位置番号 585、591、600、603、606 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号 6 の位置番号 639、645、654、657 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号 6 の位置番号 679、680、681、687、702 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号 6 の位置番号 705、708、714、720、723 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号 6 の位置番号 729、732、741、750 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、が挙げられる。より具体的には、5 ‘-cattcttgaacagtttgacaag-3’ 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5 ‘-caggcagaagaactacgtctg-3’ 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5 ‘-agarctctctgaagccgatctcgct-3’ 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5 ‘-gaagatgacgaggtcgcgag-3’ 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5 ‘-gaggatgaagatgaagac-3’ 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増

幅プライマー、5 ‘-gggtattgaccctgagctc-3’ 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5 ‘-taaccaagcatctgaagcttcaag-3’ 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5 ‘-tcaaccaaattggtcaaattgt-3’ 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5 ‘-gcggaaratatccagtaccag-3’ 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5 ‘-acgaacacgatccatcgaggta-3’ 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5 ‘-aataaatgatttctttggcatt-3’ 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5 ‘-gagyactttatcragccat-3’ 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5 ‘-gtcttcttgctcacgtactttt-3’ 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5 ‘-ttggattgaaggcggaata-3’ 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、及び 5 ‘-agtctcytggttcgatcatctgm-3’ 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、並びに上記配列からなる鎖又は相補鎖を含む遺伝子増幅プライマーが挙げられる。

上記した領域、上記した配列からなる鎖又はその相補鎖自体をプライマーとして用いることができるほか、必要に応じ、アダプター配列等の他の配列をプライマーに含めることができる。

本件発明は、これらプライマー及びプローブを他の試薬と組み合わせたビブリオコレラ又はミミカスの検出、定量又は同定用のキットを包含するものである。

本発明で用いる遺伝子増幅方法は、PCR 法に限定されない。プライマーの特異性に基づく特異増幅方法、あるいは増幅の特異的阻害方法に用いる事が可能である。また、同様に特異増幅プライマーと標識特異プローブの組み合わせによる定量増幅反応にも用いる事が出来る。また、プローブ配列は単独で用いる事も可能である。その使用方法は、固相あるいは液相に限定されない。サイバークリーンなどの増幅した二本鎖 DNA を検出する試薬を用いて行うリアルタイム PCR や FRET 等を応用したリアルタイム PCR を行う際のプライマー及びプローブとしても利用可能である。

本発明で得られた塩基配列の系統間特異性情報（図 2、3、4）を用いる事によって、高特異性を有するプローブ、及び高特異性を有しかつ増幅効率に優れた遺伝子増幅用プライマーを設計する事が可能となった。本発明で得られたビブリオコレラまたはビブリオミミカス特異的塩基情報（図 2、3、4）を基に作成した PC

R プライマーの配列を表 2 に示す。

表 2

表2. *V. cholerae*, *V. mimicus* 特異検出用プライマー

標的遺伝子	プライマー	配列	長さ	位置	方向
<i>gyrB</i>	CMgF	gaaytciggcgtgtcgatcaag	22	258 - 279	センス
	CMgR	catrtagttgttcaaagtagcg	22	564 - 543	アンチセンス
<i>rpoD</i>	CMrF	gaycciaacgacatggaaacc	21	166 - 186	センス
	CMrR	gtcagaccaaattcattaac	21	420 - 400	アンチセンス

また、系統群としての情報を得ているため、解析した配列上のほぼ全長にわたって、このような特異プライマーあるいはプローブを設計する事が可能である。

以下、本発明を実施例により詳細に説明する。実施例はその1様体であり、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願 2002-362878 号の明細書および/または図面に記載される内容を包含する。

図面の簡単な説明

図1は、*gyrB* および *rpoD* 遺伝子の部分配列を繋ぎ合わせた後に分子系統解析を行った結果を示した図。この図が近隣結合法による分子系統樹であり、ビブリオコレラ及びミミカスが他のビブリオ属細菌とは異なった単一の系統に属していることを示している。さらに、ビブリオコレラ及びミミカスもそれぞれが独立した系統群を形成していることを示している。

図2は、図1で示したビブリオコレラおよびミミカスが属するクラスターの *gyrB* 遺伝子のコンセンサス配列（上段）と近縁のクラスター（図1中の C1,2,3）の *gyrB* 遺伝子のコンセンサス配列（下段）を決定し比較した図。●で示した部位がビブリオコレラおよびミミカスに特異的な塩基であることを示す。

図3は、図1で示したビブリオコレラおよびミミカスが属するクラスターの *rpoD* 遺伝子のコンセンサス配列（上段）と近縁のクラスター（図1中の C1,2,3）の *rpoD* 遺伝子のコンセンサス配列（下段）を決定し比較した図。●で示した部位がビブリオコレラおよびミミカスに特異的な塩基であることを示す。

図4は、図1で示したビブリオコレラが属するクラスターの *gyrB* 遺伝子のコンセンサス配列（上段）とミミカスが属するクラスターの *gyrB* 遺伝子のコンセンサス配列（下段）を決定し比較した図。●で示した部位がビブリオコレラに特異的な塩基であることを示す。

図5は、図1で示したビブリオコレラが属するクラスターの *rpoD* 遺伝子のコンセンサス配列（上段）とミミカスが属するクラスターの *rpoD* 遺伝子のコンセンサス配列（下段）を決定し比較した図。●で示した部位がビブリオコレラに特異的な塩基であることを示す。

図6は、図1で示したビブリオミミカスに属するクラスターの *gyrB* 遺伝子のコンセンサス配列（上段）とビブリオコレラに属するクラスターの *gyrB* 遺伝子のコンセンサス配列（下段）を決定し比較した図。●で示した部位がビブリオミミカスに特異的な塩基であることを示す。

図7は、図1で示したビブリオミミカスに属するクラスターの *rpoD* 遺伝子のコンセンサス配列（上段）とビブリオコレラに属するクラスターの *rpoD* 遺伝子のコンセンサス配列（下段）を決定し比較した図。●で示した部位がビブリオミミカスに特異的な塩基であることを示す。

発明を実施するための最良の形態

[実施例 1]

本発明により得られた、ビブリオコレラおよびミミカスに特異的である領域を用いて設計した表2に示された遺伝子増幅用プライマーを用いた実施例を示す。尚、請求項5の(2)、請求項5の(3)、請求項11の(2)、および請求項11の(7)に記載のプライマーはそれぞれ表2中の CMgF、CMgR、CMrF および CMrR に相当する。供試菌株から抽出した染色体 DNA を鋳型とした PCR を行った。PCR は Amplitaq Gold((PE Applied Biosystems)を用いて、合計 20 μ l の反応液で行った。サーマルサイクラーの条件は、95°C10 分の加熱後に 94°C1 分、アニール（アニール温度は表5参照）1 分、72°C1 分を 35 サイクル行い、最後に 72°C10 分の伸長反応を行った。反応後のサンプルは、1%アガロースゲルで電気泳動後、臭化エチジウムで染色し紫外線照射下で遺伝子の増幅の有無を確認した。*gyrB* 遺伝子を標的とした CMgF と CMgR、*rpoD* 遺伝子を標的とした CMrF と CMrR のどちらの組み合わせにおいても、ビブリオコレラ及びミミカスに属するとされた菌株由来の DNA からのみ増幅産物が確認された（表6）。

[実施例 2]

本発明により得られた、ビブリオコレラまたはミミカスに特異的である領域を用いて設計した表3、4に示された遺伝子増幅用プライマーを用いた実施例を示す。尚、請求項19の(1)、請求項19の(3)、請求項19の(4)、請求項19の(5)、請求項25の(1)および請求項25の(14)に記載のプライマーはビ

ブリオコレラ特異的プライマーであって、それぞれ表 3 中の CF1、CF2、CR2、CR1、CrF1 および CrR1 に、さらに請求項 33 の (1)、請求項 33 の (3)、請求項 33 の (4)、請求項 33 の (5)、請求項 39 の (7) および請求項 39 の (13) に記載のプライマーはビブリオミミカス特異的であってそれぞれ表 4 中の MF1、MF2、MR2、MR1、MrF1 および MrR1 に相当する。

実施例 1 と同様に、供試菌株から抽出した染色体 DNA を鋳型とした PCR を行った（アニール温度は表 5 参照）。いずれの場合も、ビブリオコレラに特異的なプライマーはビブリオコレラのみを、ビブリオミミカスに特異的なプライマーはビブリオミミカスのみから増幅産物が検出された（表 6）。

表 3

表3. *V. cholerae*特異検出用プライマー

標的遺伝子	プライマー	配列	長さ	位置	方向
<i>gyrB</i>	CF1	ggtggttaacgcgctytct	19	33 - 51	センス
	CR2	gttaagtggaagacttcc	19	402 - 384	アンチセンス
	CF2	tgagaaagtcttccacttt	19	381 - 399	センス
	CR1	gggtaagccwgcagatcc	19	885 - 867	アンチセンス
<i>rpoD</i>	CrF1	attcttgagcagtttgatcgt	21	97 - 117	センス
	CrR1	tctgaattgaacggcgatc	21	725 - 705	アンチセンス

表 4

表4. *V. mimicus*特異検出用プライマー

標的遺伝子	プライマー	配列	長さ	位置	方向
<i>gyrB</i>	MF1	ggtagtgaatgccctgtca	19	33 - 51	センス
	MR2	gttgaagtgaatactttt	19	402 - 384	アンチセンス
	MF2	tgaaaaagtattccacttc	19	381 - 399	センス
	MR1	wggcaaacaccagckarrtct	19	885 - 867	アンチセンス
<i>rpoD</i>	MrF1	taaccaagcatctgaagcttcaag	24	423 - 446	センス
	MrR1	gtcttcttgctcacgtacttttg	24	702 - 679	アンチセンス

表 5

表5. *V. cholerae*, *V. mimicus*特異検出用プライマー-PCR条件

標的遺伝子	PCR条件				
	センスプライマー	アンチセンスプライマー	増幅産物(bp)	アニール温度(°C)	サイクル数
<i>gyrB</i> (<i>V. cholerae</i> , <i>V. mimicus</i>)	CMgF	CMgR	307	60	35
<i>rpoD</i> (<i>V. cholerae</i> , <i>V. mimicus</i>)	CMrF	CMrR	255	60	35
<i>gyrB</i> (<i>V. cholerae</i>)	CF1	CR2	370	65	35
	CF2	CR1	505	60	35
<i>rpoD</i> (<i>V. cholerae</i>)	CrF1	CrR1	629	65	35
<i>gyrB</i> (<i>V. mimicus</i>)	MF1	MR2	370	65	35
	MF2	MR1	505	60	35
<i>rpoD</i> (<i>V. mimicus</i>)	MrF1	MrR1	280	65	35

表 6

P C R													
連番	名 称	株 名 称	血清型	コレラ毒素 遺伝子	CMgF& CMgR	CMrF& CMrR	CF1& CR2	CF2& CR1	CrF1& CrR1	MF1& MR2	MF2& MR1	MrF1& MrR1	
1	<i>V. vulnificus</i>	ATCC 27562 T			-	-	-	-	-	-	-	-	
2	<i>V. vulnificus</i>	ATCC 29306			-	-	-	-	-	-	-	-	
3	<i>V. vulnificus</i>	ATCC 29307			-	-	-	-	-	-	-	-	
4	<i>V. vulnificus</i>	ATCC 33147			-	-	-	-	-	-	-	-	
5	<i>V. vulnificus</i>	ATCC 33148			-	-	-	-	-	-	-	-	
6	<i>V. vulnificus</i>	ATCC 33149			-	-	-	-	-	-	-	-	
7	<i>V. vulnificus</i>	ATCC 33814			-	-	-	-	-	-	-	-	
8	<i>V. vulnificus</i>	ATCC 33815			-	-	-	-	-	-	-	-	
9	<i>V. vulnificus</i>	ATCC 33816			-	-	-	-	-	-	-	-	
10	<i>V. vulnificus</i>	ATCC 33817			-	-	-	-	-	-	-	-	
11	<i>V. vulnificus</i>	ATCC 43382			-	-	-	-	-	-	-	-	
12	<i>V. vulnificus</i>	ATCC BAA-86			-	-	-	-	-	-	-	-	
13	<i>V. vulnificus</i>	ATCC BAA-87			-	-	-	-	-	-	-	-	
14	<i>V. vulnificus</i>	ATCC BAA-88			-	-	-	-	-	-	-	-	
15	<i>V. vulnificus</i>	ATCC BAA-89			-	-	-	-	-	-	-	-	
16	<i>V. vulnificus</i>	ATCC BAA-90			-	-	-	-	-	-	-	-	
17	<i>V. vulnificus</i>	JCM 3726			-	-	-	-	-	-	-	-	
18	<i>V. vulnificus</i>	JCM 3727			-	-	-	-	-	-	-	-	
19	<i>V. vulnificus</i>	JCM 3728			-	-	-	-	-	-	-	-	
20	<i>V. vulnificus</i>	JCM 3729			-	-	-	-	-	-	-	-	
21	<i>V. vulnificus</i>	JCM 3730			-	-	-	-	-	-	-	-	
22	<i>V. vulnificus</i>	JCM 3731			-	-	-	-	-	-	-	-	
23	<i>V. vulnificus</i>	No.4			-	-	-	-	-	-	-	-	
24	<i>V. vulnificus</i>	No.9			-	-	-	-	-	-	-	-	
25	<i>V. vulnificus</i>	No.68			-	-	-	-	-	-	-	-	
26	<i>V. vulnificus</i>	No.74			-	-	-	-	-	-	-	-	
27	<i>V. vulnificus</i>	No.81			-	-	-	-	-	-	-	-	
28	<i>V. vulnificus</i>	No.130			-	-	-	-	-	-	-	-	
29	<i>V. vulnificus</i>	No.196			-	-	-	-	-	-	-	-	
30	<i>V. vulnificus</i>	No.202			-	-	-	-	-	-	-	-	

[illegible]

連番	名 称	株 名 称	血清型	コレラ毒素 遺伝子	P G R									
					CMgF& CMgR	CMrF& CMrR	CF1& CR2	CF2& CR1	GrF1& GrR1	MF1& MR2	MF2& MR1	MrF1& MrR1		
61	<i>V. cholerae</i>	OPC60	O1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	
62	<i>V. mimicus</i>	ATCC 33583 T		-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	
63	<i>V. mimicus</i>	ATCC 33854		-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	
64	<i>V. mimicus</i>	ATCC 33855		+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	
65	<i>V. mimicus</i>	ATCC 700326		+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	
66	<i>V. diazotrophicus</i>	ATCC 33486 T			-	-	-	-	-	-	-	-	-	
67	<i>V. navarrensis</i>	ATCC 51183 T			-	-	-	-	-	-	-	-	-	
68	<i>V. metschnikovii</i>	ATCC 700040 T			-	-	-	-	-	-	-	-	-	
69	<i>V. cincinnatiensis</i>	ATCC 35912 T			-	-	-	-	-	-	-	-	-	
70	<i>V. ordalii</i>	NCIMB 2167 T			-	-	-	-	-	-	-	-	-	
71	<i>Listonella anguillarum</i>	NCIMB 6 T			-	-	-	-	-	-	-	-	-	
72	<i>V. alginolyticus</i>	IFO 15630 T			-	-	-	-	-	-	-	-	-	
73	<i>V. campbellii</i>	IFO 15631 T			-	-	-	-	-	-	-	-	-	
74	<i>V. carchariae</i>	IFO 15632 T			-	-	-	-	-	-	-	-	-	
75	<i>V. harveyi</i>	IFO 15634 T			-	-	-	-	-	-	-	-	-	
76	<i>V. nereis</i>	IFO 15637 T			-	-	-	-	-	-	-	-	-	
77	<i>V. parahaemolyticus</i>	IFO 12711 T			-	-	-	-	-	-	-	-	-	
78	<i>V. proteolyticus</i>	IFO 13287 T			-	-	-	-	-	-	-	-	-	
79	<i>V. tubiashii</i>	IFO 15644 T			-	-	-	-	-	-	-	-	-	
80	<i>Vibrio</i> sp.	V11			-	-	-	-	-	-	-	-	-	
81	<i>Vibrio</i> sp.	V41			-	-	-	-	-	-	-	-	-	
82	<i>Shewanella</i> sp.	V52			-	-	-	-	-	-	-	-	-	
83	<i>Vibrio</i> sp.	V65			-	-	-	-	-	-	-	-	-	
84	<i>Vibrio</i> sp.	V70			-	-	-	-	-	-	-	-	-	
85	<i>V. hollisae</i>	ATCC 33564 T			-	-	-	-	-	-	-	-	-	

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

産業上の利用の可能性

本件発明の *gyrB* および *rpoD* 遺伝子プライマー及びプローブは、ビブリオコレラおよびビブリオミミカスの系統関係を把握した上で設計したものであるため、特異性を向上させる検討が行われており、検出精度という点で優れている。従って、食品、臨床検体などから菌を単離せず、近縁細菌種が混雑している状況で直接検出する場合に有利になる。

請求の範囲

1. 配列表中の配列番号 1 の DNA ジャイレース β サブユニットをコードする遺伝子 (gyrB) の断片でビブリオコレラ及びビブリオミミカス菌群に特有な次の位置番号 (塩基番号とも言う) 21、96、107、126、153、190、258、270、279、285、357、543、552、557、600、690、702、714、729、733、734、759、771、782、786、792、795 又は 885 のいずれかの塩基を含む特異的な遺伝子増幅プライマー又はプローブの設計に用いることができる配列番号 1 で表される遺伝子断片。

2. 請求項 1 記載の断片を含む配列表中の配列番号 1 の DNA ジャイレース β サブユニットをコードする遺伝子 (gyrB) 中で、ビブリオコレラ及びビブリオミミカス菌群に特有な次の位置番号 21、96、107、126、153、190、258、270、279、285、357、543、552、557、600、690、702、714、729、733、734、759、771、782、786、792、795 又は 885 のいずれかの塩基を含む連続する 15 塩基以上を含む鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー。

3. 請求項 1 で指定されたビブリオコレラ及びビブリオミミカス菌群に特有な位置を 2 位置以上の高頻度で含む領域を用いることを特徴とする請求項 2 記載の遺伝子増幅プライマー。

4. 3 '末端の塩基が該ビブリオコレラ及びビブリオミミカス菌群に特有な請求項 1 で特定される位置番号の塩基であることを特徴とする請求項 2 記載の遺伝子増幅プライマー。

5. 遺伝子増幅プライマーが

- (1) 5 '-tycaywcscaaacttacca-3' 若しくは対応する相補鎖、
- (2) 5 '-gaaytctggcgtgtcgatcaag-3' 若しくは対応する相補鎖、
- (3) 5 '- catrtagttgttcaaagtacgg-3' 若しくは対応する相補鎖、
- (4) 5 '- ggatttyacytccgaagaaacyagc -3' 若しくは対応する相補鎖、
- (5) 5 '- ygccagcttctcattcatr -3' 若しくは対応する相補鎖、
- (6) 5 '-cgcttcgcttgggttttcc-3' 若しくは対応する相補鎖、又は
- (7) 5 '-caataatcttcgaacaaacgt-3' 若しくは対応する相補鎖のいずれかを含む請求項 2 記載の遺伝子増幅プライマー。

6. 配列表中の配列番号1のDNA ジャイレース β サブユニットをコードする遺伝子 (gyrB) 中で、ビブリオコレラ及びビブリオミミカス菌群に特有な次の位置番号 21、96、107、126、153、190、258、270、279、285、357、543、552、557、600、690、702、714、729、733、734、759、771、782、786、792、795 又は 885 のいずれかの塩基を含む連続する 15 塩基以上を含む鎖又はその相補鎖を含むビブリオコレラ及びビブリオミミカス検出、定量又は同定用プローブ。

7. 配列表中の配列番号2のRNA ポリメラーゼ σ 70 因子をコードする遺伝子 (rpoD) 中で、ビブリオコレラ及びビブリオミミカス菌群に特有な次の位置番号 3、27、66、67、75、90、117、123、141、144、177、178、180、186、223、227、228、231、250、251、255、257、259、264、300、301、302、303、305、313、314、350、351、362、369、373、374、380、390、400、402、409、410、415、416、423、427、433、444、447、504、510、513、543、556、558、618、638、649、663、685、711、747、757、762、763、又は 789 のいずれかの塩基を含む、特異的な遺伝子増幅プライマー又はプローブの設計に用いることができる配列番号2で表される遺伝子の断片。

8. 配列表中の配列番号2のRNA ポリメラーゼ σ 70 因子をコードする遺伝子 (rpoD) 中で、ビブリオコレラ及びビブリオミミカス菌群に特有な次の位置番号 3、27、66、67、75、90、117、123、141、144、177、178、180、186、223、227、228、231、250、251、255、257、259、264、300、301、302、303、305、313、314、350、351、362、369、373、374、380、390、400、402、409、410、415、416、423、427、433、444、447、504、510、513、543、556、558、618、638、649、663、685、711、747、757、762、763、又は 789 のいずれかの塩基を含む連続する 15 塩基以上を含む鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー。

9. 請求項8で指定されたビブリオコレラ及びビブリオミミカス菌群に特有な位置を2位置以上の高頻度で含む領域を用いることを特徴とする請求項8記載の遺伝子増幅プライマー。

10. 3'末端の塩基が該ビブリオコレラ及びビブリオミミカス菌群に特有な請求項8で特定される位置番号の塩基であることを特徴とする請求項8記載の遺伝子増幅プライマー。

1 1. 遺伝子増幅プライマーが

- (1) 5 ‘-gattgctgagtatcctggaaccatc-3’ 若しくは対応する相補鎖、
- (2) 5 ‘-gaycctaacgacatggaaacc-3’ 若しくは対応する相補鎖、
- (3) 5 ‘-ttcwgarcctytctgaagcs-3’ 若しくは対応する相補鎖、
- (4) 5 ‘-agatgaygmkgctcgysgar-3’ 若しくは対応する相補鎖、
- (5) 5 ‘-cgacggtgaaagyagcgacag-3’ 若しくは対応する相補鎖、
- (6) 5 ‘-caatgaactgcgcggyaagtt-3’ 若しくは対応する相補鎖、
- (7) 5 ‘-gtcacgaccaaattcattaac-3’ 若しくは対応する相補鎖、
- (8) 5 ‘-gyytgamgcttcagawgcttgrtka-3’ 若しくは対応する相補鎖、
- (9) 5 ‘-ygargtrcgcagagtttcaacc-3’ 若しくは対応する相補鎖、
- (1 0) 5 ‘-catyaccaarcgytcttgg-3’ 若しくは対応する相補鎖、又は
- (1 1) 5 ‘-cgytcaacagacagtgaawtc-3’ 若しくは対応する相補鎖のいずれかを
含む請求項 8 項記載の遺伝子増幅プライマー。

1 2. 配列表中の配列番号 2 の RNA ポリメラー $\sigma 70$ 因子をコードする遺伝子 (rpoD) 中で、ビブリオコレラ及びビブリオミミカス菌群に特有な次の位置番号 3、27、66、67、75、90、117、123、141、144、177、178、180、186、223、227、228、231、250、251、255、257、259、264、300、301、302、303、305、313、314、350、351、362、369、373、374、380、390、400、402、409、410、415、416、423、427、433、444、447、504、510、513、543、556、558、618、638、649、663、685、711、747、757、762、763、又は 789 のいずれかの塩基を含む連続する 15 塩基以上を含む鎖又はその相補鎖を含むビブリオコレラ及びビブリオミミカス菌群検出、定量又は同定用プローブ。

1 3. 請求項 2 - 6、又は 8 - 1 2 のいずれか 1 項に記載のプライマー又はプローブを用いるビブリオコレラ及びビブリオミミカス菌群を検出、定量又は同定する方法。

1 4. 請求項 2 - 6、又は 8 - 1 2 のいずれか 1 項に記載のプライマー又はプローブを用いるビブリオコレラ及びビブリオミミカス菌群を検出、定量又は同定するキット。

1 5. 配列表中の配列番号 3 の DNA ジャイレース β サブユニットをコードす

る遺伝子 (gyrB) 中で、ビブリオコレラ菌群に特有な次の位置番号 15、36、39、42、45、48、51、90、111、133、226、285、291、306、330、384、390、399、507、708、756、837、867、873、879、882、又は 885 のいずれかの塩基を含む、特異的な遺伝子増幅プライマー又はプローブの設計に用いることができる配列番号 3 で表される遺伝子の断片。

16. 配列表中の配列番号 3 の DNA ジャイレース β サブユニットをコードする遺伝子 (gyrB) 中で、ビブリオコレラ菌群に特有な次の位置番号 15、36、39、42、45、48、51、90、111、133、226、285、291、306、330、384、390、399、507、708、756、837、867、873、879、882、又は 885 のいずれかの塩基を含む連続する 15 塩基以上を含む鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー。

17. 3'末端の塩基がビブリオコレラ菌群に特有な請求項 16 で特定される位置番号の塩基であることを特徴とする請求項 16 記載の遺伝子増幅プライマー。

18. 請求項 16 で指定されたビブリオコレラ菌群に特有な位置を 2 以上の高頻度で含む領域を用いることを特徴とする請求項 16 記載の遺伝子増幅プライマー。

19. 遺伝子増幅プライマーが

- (1) 5'-ggtggttaacgcgctytct-3' 若しくは対応する相補鎖、
- (2) 5'-ycgatgaacgtgaagaagataaa-3' 若しくは対応する相補鎖、
- (3) 5'-tgagaaagtcttccacttt-3' 若しくは対応する相補鎖、
- (4) 5'-gttaaagtgaagactttc-3' 若しくは対応する相補鎖、又は
- (5) 5'-gggtaagccwgcaagatcc-3' 若しくは対応する相補鎖、のいずれかを含む請求項 16 項記載のプライマー。

20. 配列表中の配列番号 3 の DNA ジャイレース β サブユニットをコードする遺伝子 (gyrB) 中で、ビブリオコレラ菌群に特有な次の位置番号 15、36、39、42、45、48、51、90、111、133、226、285、291、306、330、384、390、399、507、708、756、837、867、873、879、882、又は 885 のいずれかの塩基を含む連続する 15 塩基以上を含む鎖又はその相補鎖を含むビブリオコレラ菌群検出、定量又は同定用プローブ。

21. 配列表中の配列番号 4 の RNA ポリメラー $\sigma 70$ 因子をコードする遺伝

子 (rpoD) 中で、ビブリオコレラ菌群に特有な次の位置番号 12、93、96、105、114、115、116、117、126、132、141、156、198、201、216、222、231、240、252、254、255、260、261、264、276、285、291、327、333、342、345、424、426、432、441、445、446、448、450、453、468、489、495、501、519、522、525、540、549、570、585、591、600、603、606、639、645、654、657、666、675、679、680、681、687、702、705、708、714、720、723、729、732、741、750、765、768、795 又は 804 のいずれかの塩基を含む、特異的な遺伝子増幅プライマー又はプローブの設計に用いることができる配列番号 4 で表される遺伝子の断片。

22. 配列表中の配列番号 4 の RNA ポリメラー $\sigma 70$ 因子をコードする遺伝子 (rpoD) 中で、ビブリオコレラ菌群に特有な次の位置番号 12、93、96、105、114、115、116、117、126、132、141、156、198、201、216、222、231、240、252、254、255、260、261、264、276、285、291、327、333、342、345、424、426、432、441、445、446、448、450、453、468、489、495、501、519、522、525、540、549、570、585、591、600、603、606、639、645、654、657、666、675、679、680、681、687、702、705、708、714、720、723、729、732、741、750、765、768、795 又は 804 のいずれかの塩基を含む連続する 15 塩基以上を含む鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー。

23. 3'末端の塩基が該ビブリオコレラ菌群に特有な請求項 22 で特定される位置番号の塩基であることを特徴とする請求項 22 記載の遺伝子増幅プライマー。

24. 請求項 22 で指定されたビブリオコレラ菌群に特有な位置を 2 以上の高頻度で含む領域を用いることを特徴とする請求項 22 記載の遺伝子増幅プライマー。

25. 遺伝子増幅プライマーが、

- (1) 5' -attcttgagcagtttgatcgt-3' 若しくは対応する相補鎖、
- (2) 5' -caggccgaagagctacgtctc-3' 若しくは対応する相補鎖、
- (3) 5' -tgagctttctgaagcgatctcgcg-3' 若しくは対応する相補鎖、
- (4) 5' -gaagatgatgctgtcgtcgaa-3' 若しくは対応する相補鎖、
- (5) 5' -gaagatgaagacgaagat-3' 若しくは対応する相補鎖、

(6) 5 ‘-cggtatcgaccctgaactg-3’ 若しくは対応する相補鎖、
(7) 5 ‘-catcaagcttctgaagcgctcaga-3’ 若しくは対応する相補鎖、
(8) 5 ‘-acggaagatatccarcactaa-3’ 若しくは対応する相補鎖、
(9) 5 ‘-tcaaccaagtggctcgaattgc-3’ 若しくは対応する相補鎖、
(10) 5 ‘-gcgaacacgatccattgaagtg-3’ 若しくは対応する相補鎖、
(11) 5 ‘-gatgaacgatttcttcggcatc-3’ 若しくは対応する相補鎖、
(12) 5 ‘-aaggactttatccagccac-3’ 若しくは対応する相補鎖、
(13) 5 ‘-ttcttcttgctcacggactttcgc-3’ 若しくは対応する相補鎖、
(14) 5 ‘-ttctgaattgaacggcggatc-3’ 若しくは対応する相補鎖、又は
(15) 5 ‘-tgtctcttgctcgatcatttgt-3’ 若しくは対応する相補鎖のいずれかを含む請求項 22 記載の遺伝子増幅プライマー。

26. 配列表中の配列番号 4 の RNA ポリメラー σ 70 因子をコードする遺伝子 (rpoD) 中で、ビブリオコレラ菌群に特有な次の位置番号 12、93、96、105、114、115、116、117、126、132、141、156、198、201、216、222、231、240、252、254、255、260、261、264、276、285、291、327、333、342、345、424、426、432、441、445、446、448、450、453、468、489、495、501、519、522、525、540、549、570、585、591、600、603、606、639、645、654、657、666、675、679、680、681、687、702、705、708、714、720、723、729、732、741、750、765、768、795 又は 804 のいずれかの塩基を含む連続する 15 塩基以上を含む鎖又はその相補鎖を含むビブリオコレラ菌群検出、定量又は同定用プローブ。

27. 請求項 16-20、又は 22-26 のいずれか 1 項に記載のプライマー又はプローブを用いるビブリオコレラ菌群を検出、定量又は同定する方法。

28. 請求項 16-20、又は 22-26 のいずれか 1 項に記載のプライマー又はプローブを用いるビブリオコレラ菌群を検出、定量又は同定するキット。

29. 配列表中の配列番号 5 の DNA ジャイレース β サブユニットをコードする遺伝子 (gyrB) 中で、ビブリオミカス菌群に特有な次の位置番号 15、36、39、42、45、48、51、90、111、133、226、285、291、306、330、384、390、399、507、708、756、837、867、873、879、882、又は 885 のいずれかの塩基を含む、特異的な遺伝子増幅プライマー又はプローブの設計に用いることができる配列番号

5で表される遺伝子の断片。

30. 配列表中の配列番号3のDNA ジャイレース β サブユニットをコードする遺伝子 (*gyrB*) 中で、ビブリオミミカス菌群に特有な次の位置番号15、36、39、42、45、48、51、90、111、133、226、285、291、306、330、384、390、399、507、708、756、837、867、873、879、882、又は885のいずれかの塩基を含む連続する15塩基以上を含む鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー。

31. 請求項30で指定されたビブリオミミカス菌群に特有な位置を2以上の高頻度で含む領域を用いることを特徴とする請求項30記載の遺伝子増幅プライマー。

32. 3'末端の塩基が該ビブリオミミカス菌群に特有な請求項31で特定される位置番号の塩基であることを特徴とする請求項30記載の遺伝子増幅プライマー

33. 遺伝子増幅プライマーが

- (1) 5'-ggtagtgaatgccctgtca-3' 若しくは対応する相補鎖、
- (2) 5'-cggatgagcgtgaagaagataag-3' 若しくは対応する相補鎖、
- (3) 5'-tgaaaaagtattccacttc-3' 若しくは対応する相補鎖、
- (4) 5'-gttgaagtgaataactttt-3' 若しくは対応する相補鎖、又は
- (5) 5'-wggcaaaccagckarrtct-3' 若しくは対応する相補鎖のいずれかを含む請求項30記載の遺伝子増幅プライマー。

34. 配列表中の配列番号5のDNA ジャイレース β サブユニットをコードする遺伝子 (*gyrB*) 中で、ビブリオミミカス菌群に特有な次の位置番号15、36、39、42、45、48、51、90、111、133、226、285、291、306、330、384、390、399、507、708、756、837、867、873、879、882、又は885のいずれかの塩基を含む連続する15塩基以上を含む鎖又はその相補鎖を含むビブリオミミカス菌群検出、定量又は同定用プローブ。

35. 配列表中の配列番号6のRNA ポリメラーゼ σ 70因子をコードする遺伝子 (*rpoD*) 中で、ビブリオミミカス菌群に特有な次の位置番号12、93、96、105、114、115、116、117、126、132、141、156、198、201、216、222、231、240、252、254、255、260、261、264、276、285、291、327、333、342、345、424、426、

432、441、445、446、448、450、453、468、489、495、501、519、522、525、540、549、570、585、591、600、603、606、639、645、654、657、666、675、679、680、681、687、702、705、708、714、720、723、729、732、741、750、765、768、795 又は 804 のいずれかの塩基を含む、特異的な遺伝子増幅プライマー又はプローブの設計に用いることができる配列番号 6 で表される遺伝子の断片。

36. 配列表中の配列番号 6 の RNA ポリメラー σ 70 因子をコードする遺伝子 (rpoD) 中で、ビブリオミミカス菌群に特有な次の位置番号 12、93、96、105、114、115、116、117、126、132、141、156、198、201、216、222、231、240、252、254、255、260、261、264、276、285、291、327、333、342、345、424、426、432、441、445、446、448、450、453、468、489、495、501、519、522、525、540、549、570、585、591、600、603、606、639、645、654、657、666、675、679、680、681、687、702、705、708、714、720、723、729、732、741、750、765、768、795 又は 804 のいずれかの塩基を含む連続する 15 塩基以上を含む鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー。

37. 請求項 36 で指定されたビブリオミミカス菌群に特有な位置を 2 以上の高頻度で含む領域を用いることを特徴とする請求項 36 記載の遺伝子増幅プライマー。

38. 3'末端の塩基が該ビブリオミミカス菌群に特有な請求項 36 で特定される位置番号の塩基であることを特徴とする請求項 36 記載の遺伝子増幅プライマー。

39. 遺伝子プライマーが

- (1) 5' -cattcttgaacagtttgacaag-3' 若しくは対応する相補鎖、
- (2) 5' -caggcagaagaactacgtctg-3' 若しくは対応する相補鎖、
- (3) 5' -agarctctctgaagccgatctcgct-3' 若しくは対応する相補鎖、
- (4) 5' -gaagatgacgaggtcgcgag-3' 若しくは対応する相補鎖、
- (5) 5' -gaggatgaagatgaagac-3' 若しくは対応する相補鎖、
- (6) 5' -gggtattgaccctgagctc-3' 若しくは対応する相補鎖、
- (7) 5' -taacaaagcatctgaagcttcaag-3' 若しくは対応する相補鎖、
- (8) 5' -gcggaaratatccagtaccag-3' 若しくは対応する相補鎖、

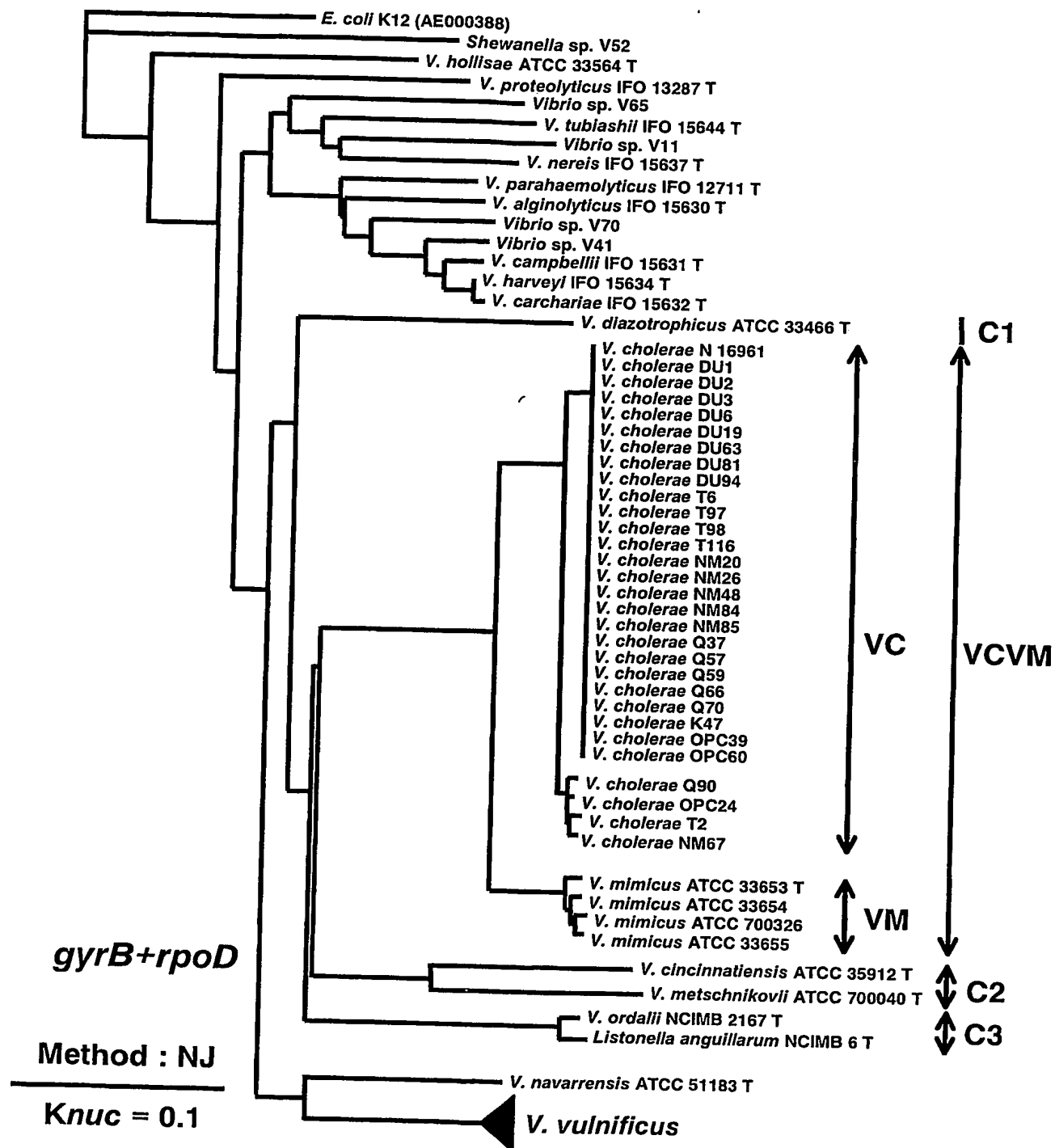
(9) 5 ‘-tcaaccaaattggtcaaattgt-3’ 若しくは対応する相補鎖、
(10) 5 ‘-acgaacacgatccatcgaggta-3’ 若しくは対応する相補鎖、
(11) 5 ‘-aataaatgatttctttggcatt-3’ 若しくは対応する相補鎖、
(12) 5 ‘-gagyactttatcragccat-3’ 若しくは対応する相補鎖、
(13) 5 ‘-gtcttcttgctcacgtactttttg-3’ 若しくは対応する相補鎖、
(14) 5 ‘-ttggattgaagggcgaata-3’ 若しくは対応する相補鎖、又は
(15) 5 ‘-agtctcytggttcgatcatctgm-3’ 若しくは対応する相補鎖のいずれかを含む請求項 36 記載の遺伝子増幅プライマー。

40. 配列表中の配列番号 6 の RNA ポリメラー $\sigma 70$ 因子をコードする遺伝子 (rpoD) 中で、ビブリオミミカス菌群に特有な次の位置番号 12、93、96、105、114、115、116、117、126、132、141、156、198、201、216、222、231、240、252、254、255、260、261、264、276、285、291、327、333、342、345、424、426、432、441、445、446、448、450、453、468、489、495、501、519、522、525、540、549、570、585、591、600、603、606、639、645、654、657、666、675、679、680、681、687、702、705、708、714、720、723、729、732、741、750、765、768、795 又は 804 のいずれかの塩基を含む連続する 15 塩基以上を含む鎖又はその相補鎖を含むビブリオミミカス菌群検出、定量又は同定用プローブ。

41. 請求項 30-34、又は 36-40 のいずれか 1 項に記載のプライマー又はプローブを用いるビブリオミミカス菌群を検出、定量又は同定する方法。

42. 請求項 30-34、又は 36-40 のいずれか 1 項に記載のプライマー又はプローブを用いるビブリオミミカス菌群を検出、定量又は同定するキット。

図 1





VCVM-gyrB.con	1	GTMTCCGGYGGTCTRCACGGGGTAGGTGTGTCGGTRGTAAAYGCSTBTWCWAAAAAGTG	60
3,4,5,gyrB.con	1	..H..N..T..YY...Y..C..N..K..K..N..B..Y..C..VY.D.....D	60
		** ** ** ** **	
		*** ** ** ** **	
		*** ** ** ** * *****	
VCVM-gyrB.con	61	CTRCTBACCATYATATCGYGGYGGCAARATYCAWCSAACTTACCATCAYGGTGTGCCA	120
3,4,5,gyrB.con	61	Y.DY.R..Y...Y.Y...RR...HVMH.YB...A.W....B..YGY....B..D..W	120
		* * * * *	
		*** ** ** * ***** **	
		*** ** ** * ***** **	
VCVM-gyrB.con	121	CAAGCACCGTTGKCTGTRGTRGGTGAKACWAGCGTACCGGTACTACCGTACGTTCTGG	180
3,4,5,gyrB.con	121B..VY.RRSB..K..B..W..D..B..WMRH..H..D..W..VB.D..Y..Y...	180
		***** ** *	
		** ** ** ** **	
		** ** ** ** *	
VCVM-gyrB.con	181	CCWAGYGCACARACYTTTACCAATATCGAATTTCATACGACATTYGGCTAAACGYCTG	240
3,4,5,gyrB.con	181	..R..T..HG.V..B..Y....Y..Y....C..Y..Y..H....D....R...Y.R	240
		** ** ** *	
		** ** ** ** *	
		***** ** ** ** ***** ** *	
VCVM-gyrB.con	241	CGTGAGCTGTCAATCCCTGAAYTCTGGCGTGTGCGATCAAGCTGAYSGATGARGCTGAAGAA	300
3,4,5,gyrB.con	241	..Y..R..B..W..YY.A..C..W..B..H..V..YMRWY.RHW...H....MR	300
		** ** ** ** *	
		** ** ** ** *	
		***** ** ** *****	
VCVM-gyrB.con	301	GATAAARAAGACCACTTYATGTATGAAGGKGGTATTCAGCGTGTGTACCCACTTGAAC	360
3,4,5,gyrB.con	301	..Y..AM.M..Y..Y....KR.....K..YMR...R..Y...RSY..YY.H..Y	360
		** ** * ** ** ***** **	
		***** ** ** ***** **	
		*** ** ** ** *	
		** ** ** ** *	
VCVM-gyrB.con	361	CGYAAAYAAAACGCCCRATCCATGARAAAAGTMTTCCACTTYAACCAAGAGCGTGAAGATGGC	420
3,4,5,gyrB.con	361	..C.....K..S..Y....V.....R.....Y....RYMW..V.....M..Y..B	420
		** ***** ** ** ***** *****	
		***** *****	
		** ***** ** *	

VCVM-gyrb.con	421	ATCAGCGTGAAGTGGCRATGCAGTGGAAAGATGGTTTCCAAGAAACATCTACTGCTTT	480
3,4,5,gyrb.con	421	YYWSY..K.....V.....R.....Y..Y.....RRY..Y.....Y...	480
	*	** ***** ** ***** ***** ** ***** ** ***** ** *	
VCVM-gyrb.con	481	ACYAACAAATYCCACAGCGTGATGGYGGTACCCAYTTAGCYGGTTCCGTGGTGCRRTG	540
3,4,5,gyrb.con	481	..C..Y..Y.....W..R..Y.....B..DR.H..C.....S..D.....Y..SN...Y..R	540
		** ** ** ***** ** ** ***** ** ** ***** ** ***** ** *	
VCVM-gyrb.con	541	ACCCGTACTTTGAACAACTAYATGGAYAAAGAGGCTTCTCGAAGAAAGCSCAAGCRGCA	600
3,4,5,gyrb.con	541	..K..W..BY.H..Y..C..W.....W..R.....S..WYWS..R.....M..R..VK..G	600
		** ** ** * ** * ** ***** ** ***** * ** ***** ** *	
VCVM-gyrb.con	601	ACCTCGGGTGATGATGCGCGTGAAAGGCTTAACRGC DGT KGT DTCGGTGAAAGTRCCRGAT	660
3,4,5,gyrb.con	601	..V..K..Y..Y.....K.....Y..R..N..V..B..Y..D..B.....K..D...	660
		** ** ** ***** ***** ** ** ** ** ** ** ***** ** *	
VCVM-gyrb.con	661	CCTAAATTCRAGCCAAACCAAGATAAGCTRGTTCTTCGGARGTRAAATCCGCRGTT	720
3,4,5,gyrb.con	661	..W..R.....H.....Y.....Y..AY....B..W..Y.....G..RD..K.....K	720
		** ** ***** ***** ** ***** ** ***** ** ***** ** *	
VCVM-gyrb.con	721	GARTCAGCYATGAATGAGAAGCTGGCRGATTTCCTRGC GGA AACC AAGCGAAGCGAAA	780
3,4,5,gyrb.con	721D..R...GGY..R..RY.BRMB..K..YY....H..RM..Y..HWST.....N...	780
		***** ** *** ** ** * ** ** ***** ** ** ***** ** *	
VCVM-gyrb.con	781	AACGTTGTTCGAAGATTATTGATGCRGCRGCGHCKCGTGAGCVGCGGCTAAAGCMCGK	840
3,4,5,gyrb.con	781	YS..S...WSH..A..Y..Y.....V..W..W..H..Y.....V.....B..T	840
		* ** *** ** ** ** ***** ** ** ** ***** ***** *	
VCVM-gyrb.con	841	GAAATGACYCGYCGTAAAGGCGGYTRGAYYTHGCWGGYTRRCCH	885
3,4,5,gyrb.con	841	..R.....N..T.....B..R..V...C.KR....TY..D..R	885
		** ***** ** ***** ** ** ***** ** ***** ** *	

[3]

VCVM-rpOD.con 3,4,5-rpOD.con 1 ACACGTGAAGGYAAATCGATATTGCCAAGCGCATTTGAAGATGGTATTAAACCAAGTTCAA 60
 1 .T..Y.....T..R..Y.....Y..K..R..Y..Y.....W.....Y.....W..... 60
 ** ** ***** ** ** ***** ** ** ** ***** ***** ** **

VCVM-rpOD.con 3,4,5-rpOD.con 61 AGTGGGATGTCTGAGTATCCTGGAAACCATCCCWTAATCTTGARCAGTTTGAYMRKGT 120
 61 M.Y..HG.K.....A..Y..H..H..N..T.....YY.W.....R..Y...AAA... 120
 * ** * ***** ** ** ** ***** * ***** ** ** *

VCVM-rpOD.con 3,4,5-rpOD.con 121 CAGGCMGAAGARCTACGTCTSACTGAYCTGATTCWGGTTTCGTTGAYCCCTAACGACATG 180
 121 .WW..W..R...Y.W..YY.A..M...M.V..YWSH.....YR.H.....DR.YKMWGWT 180
 * ** ** ***** ** ** * ***** * ***** *

VCVM-rpOD.con 3,4,5-rpOD.con 181 GAAACCGAAGCGCCAAACYGCKACTCACATCGGTTTCWGARTYCTGAAGCSGATCTCGCK 240
 181 .V.RSDRMN..N.....D..R..N..Y....Y.A...Y.DR.HRGYK.W..Y..H.MT 240
 * * ** ***** ** ** * ***** ** ** * * ** *

VCVM-rpOD.con 3,4,5-rpOD.con 241 GATGAAGATGAYGKGTCTGYSGARGATGAAGACGARGATGAAGAYGAAGAYGGCGACGGT 300
 241 ..Y..M..YAGTRAM.AYM.Y..YSWY.....Y..W..Y..V...RM...R.Y..HRRC 300
 ** ** ** * * * ***** ** ** * ***** ** ** *

VCVM-rpOD.con 3,4,5-rpOD.con 301 GAAAGYAGCGACAGCGGAAGAAGTSGGTATYGACCCCTGARTSGCTCGTGAGAAATC 360
 301 AGCRM.RVRRYKMY.....DRYH..H..C..Y.....K..DYTA..R.....Y 360
 * ***** ** ** ** ***** ** ** *****

VCVM-rpOD.con 3,4,5-rpOD.con 361 AATGAACTGCGCGGYAAGTTCCAAACCTGCAATTAGCGGTTAATGAATTTGGTCGTGAC 420
 361 .CY..RY.W..YAA.M.R.AY..RR.YY.W..RY.H..KAWM..Y..RCAY..YDAYR.B 420
 * ** * ** * * * * * * * * * * * * *

VCVM-rpod.con 421 AGTMAYCAAGCWTCTGAAGCKTCARRCYTRGTRYTGGAATATYTTCCGYGAATCCGYCTA 480
 3,4,5-rpod.con 421 ..CHMHAM.R.YSMNS...NW.YGAR..DR....VRMKR.....R..Y..HY.V 480
 ** * * **** * ** **** ***** ** *
 VCVM-rpod.con 481 ACACCAARCAATTYGACCAYTTGGTTGAAACTCTGCCGYACYTCRATGGATCGTGTTCGY 540
 3,4,5-rpod.con 481 ..R..D....R....YY..Y.H..HRMY.MR..DM...M...W.....W..Y..D... 540
 ** ** ***** ***** ** * ** ** ** ***** ** **
 VCVM-rpod.con 541 ACCCAAGARCGYTTGGTTRATGAAAGCVGTRGTTGAAGTCGCGAARATGCCRAAGAAATCR 600
 3,4,5-rpod.con 541 ..W.....A...Y..A.C...MRVD.K.YK..Y...DWM.SK.....K..R..R..A 600
 ** ***** ** * ** * ** * ** ***** ** **
 VCVM-rpod.con 601 TTYATYGCYCTRRTTACAGGCAATGAATCGAATGARGARTGGCTBGATAAAGTVCTYGGCT 660
 3,4,5-rpod.con 601K.VB.M..Y..Y.Y.....DRRY..W.CW...Y.W..YS..R.HM....D 660
 ***** * * * * * ***** ** * ** * ** * * *
 VCVM-rpod.con 661 TCTGAYAACRCCTTAYGTASMRAAAGTMCGTGAGCAAGAAGAMGAKATYCGCCGYTCAATY 720
 3,4,5-rpod.con 661 W.M..W.....W....YWG.M..RA.YM.HSMVV.W.....RRHB.....T.....W... 720
 * ** ***** ***** * ** * * * ***** ***** **
 VCVM-rpod.con 721 CARAAACTDCARATGATCGARCARGACGACWTCACTGTCTGTTGARGCYATCAAAGACATC 780
 3,4,5-rpod.con 721 ..W..RY.RMRW..B..Y...S.A..A..V..WY.NRMK..RMRHMR...Y....Y..Y 780
 ** ** * ** ** ** * ** * ** * ** * ** ***** **
 VCVM-rpod.con 781 AGCCGTCGTATGTCWATCGGTGARGCRAAAGCTCGCCGTGCG 822
 3,4,5-rpod.con 781Y..C.....Y....A..K.....Y..W... 823
 ***** ** ***** ** ***** ** ***** **

gyrB-VC.con	1	GTMTCCGGYGGTCTGTCACGGGGTAGGTGTGTCGGTGGTTAAACGGGCTTCTGAAAAAGTG	60
gyrB-VM.con	1	.C.....T.....A.....A.....A..G..T..C..G..A.....	60
		** *****	
gyrB-VC.con	61	CTRCTYACCATYTATCGYGGYGCAARATCCAYWCSCAAACTTACCATCATGGTGTGCCA	120
gyrB-VM.con	61	.G..B.....T.....T.....G..T..CA.C.....C.....	120
		** *****	
gyrB-VC.con	121	CAAGCACCGTTGGCTGTRGTRGGTGAKACWGAGCGGTACCGGTACTACCGTACGTTCTGG	180
gyrB-VM.con	121T.....G.....G..T.....	180
		** *****	
gyrB-VC.con	181	CCWAGYGCACARACYTTTACCAATATCGAATTTCATACGACATTTTGGCTAAACGCCCTG	240
gyrB-VM.con	181	.T..T.....G..T.....C.....C.....Y...	240
		** *****	
gyrB-VC.con	241	CGTGAGCTGTCTCCTGGAAYTCTGGCGTGTGCGATCAAGCTGAYCGATGAACGGAAGAA	300
gyrB-VM.con	241C.....CG.....G.....	300
		** *****	
gyrB-VC.con	301	GATAAAAGACCACTTCATGTATGAAGGGGGTATTCAAGCGTTGTGACCCACTTGAAC	360
gyrB-VM.con	301G.....Y.....T.....K.....	360
		** *****	
gyrB-VC.con	361	CGYAAYAAAACGCCRATCCATGAGAAAGTCTTCCACTTTAA CCAAGAGCGTGAAGATGGC	420
gyrB-VM.con	361	.T.....G.....A.....A.....C.....	420
		** *****	

図 4 7pキ

gyrB-VC.con	421	ATCAGCGTGAAGTGGCRATGCAGTGGAAYGATGGTTCCAAGAAACATCTACTGCTTT	480
gyrB-VM.con	421A.....C.....	480

gyrB-VC.con	481	ACYAACAAACATCCACAGCGTGATGGTGGTACCCAYTTAGCCGGTTTCCGTTGGTGGCTTG	540
gyrB-VM.con	481	..C.....Y.....C.....C.....Y.....R...	540
		** *****	
gyrB-VC.con	541	ACCCGTAATTGAACAACACTAYATGGAYAAAGAGGCTTCTCGAAGAAAGCSAAGCGGCA	600
gyrB-VM.con	541C.....C.....R...	600

gyrB-VC.con	601	ACCTCGGGTGATGATGCGCGGTGAAGGCTTAACGGCGWGTGGTWTGGTGAAAGTGCCGGAT	660
gyrB-VM.con	601R..K..K.....R..R...	660

gyrB-VC.con	661	CCTAAATTCRAGCCAAACCAAGATAAGCTGGTTCTTCGGGAAGTAAATCCGCRGTT	720
gyrB-VM.con	661R.....R..G.....G...	720

gyrB-VC.con	721	GARTCAGCYATGAATGAGAAGCTGGCRGATTCCTAGCGGAAACCCCAAGCGAAGCGAAA	780
gyrB-VM.con	721	..G.....C.....G.....G.....	780
		** *****	
gyrB-VC.con	781	AACGTTTGTTCGAAGATTATTGATGCRGCRGCGYGCXCGTGAAGCSGCGTAAAGCCCGK	840
gyrB-VM.con	781H..T.....V.....A..T	840

gyrB-VC.con	841	GAAATGACTCGYCGTAAAGGCGCGYTGGATCTTGCWGGCTTACCC	885
gyrB-VM.con	841Y..T.....C.A..YY.M..T..T..G..W	885

rpod-VC.con	1	ACACGTGAAGGTGAAATCGATATTGCCAAGCGCATTGAAGATGGTATTAA CCAAGTTCAA	60
rpod-VM.con	1C.....	60

rpod-VC.con	61	AGTGGGATTGCTGAGTATCCTGGAAACCATCCCTTATATTCTTGAGCAGTTTGATCGTGTT	120
rpod-VM.con	61A.....A.C.....A.....A.....CAAG...	120

rpod-VC.con	121	CAGGCCGAAGAGCTACGTCTCACTGACCTGATTTCAGGTTTCGTTGAYCCTAACGACATG	180
rpod-VM.con	121A....A.....G....Y.....T.....T.....	180

rpod-VC.con	181	GAAACCGAAGCGCCAACCCGCGACTCACATCGGTTCTGAGCTTCTGAAGCGGATCTCGCG	240
rpod-VM.con	181T.....T.....A.....A.R..C.....C.....T	240

rpod-VC.con	241	GATGAAGATGATGCTGTCGTCGAAAGATGAAGACGAAGATGAAGATGGCGACGGT	300
rpod-VM.con	241C.AG....CG..G.....G.....T.....C.....	300

rpod-VC.con	301	GAAAGCAGCGACAGCGAAGAAGTCGGTATCGACCCCTGAACCTGGCTCGTGAGAAATTC	360
rpod-VM.con	301Y.....G.....T.....G..C.....	360

rpod-VC.con	361	AATGAACTGCGCGGYAAGTCCAAAACCTGCAATTAGCGGTTAATGAATTGGTCGTGAC	420
rpod-VM.con	361C.....	420

421	AGTCATCAAGCTTCTGAAGCGTCAGACTTAGTGYTGGATATCTCCGTGAATCCGYCTA	480
421	..A.C.....A.....T...AG.C.G..AC.....Y.....C.....C...	480
	*** * ***** ***** * * * * * ***** ***** ***	
481	ACACCAAAGCAATTCGACCACCTTGGTTGAAACTCTGCGCACTTCAATGGATCGTGTTCGC	540
481A.....T.....T.....T.....T..C.G.....T.....T	540
	***** ***** ***** ***** * * * * * ***** *****	
541	ACCCAAAGAACGTTTGGTRATGAAGCGGTAGTTGAAGTCGCGAAGATGCCGAAGAAATCG	600
541G..Y.....G.....V..G.....A.....A.....A.....A	600
	***** * * * * * ***** * * * * * ***** *****	
601	TTCATCGCCCTATTACAGGCAATGAATCGAATGAAGAGTGGCTGGATAAAGTCCTTGCT	660
601	..T..T..Y..R.....R..A.....Y.....R..C...	660
	** ** * * * ***** ***** * * * * * ***** *****	
661	TCTGACAAGCCTTACGTAAGCAAGTCCGTGAGCAAGAAAGAGATCCGCCGTTCAATT	720
661T..R....T...CAA....A.....C..T..T....C.....C	720
	***** * * * * * ***** ***** ***** * * * * * *****	
721	CAGAAACTACAAATGATCGAGCAAGAGACATCAGTCTGTGTAACGCATCAAAGACATC	780
721	..A.....K..G.....A..R.....T.....G..T.....	780
	** ***** * * * * * ***** ***** * * * * * *****	
781	AGCCGTCGTATGTCAATCGGTGAGGCRAAAGCTGCCGTCGC	822
781T.....A..G.....	822
	***** ***** ***** * * * * * ***** *****	

 6

```

gyrB-VM.con      1 GTCTCCGGTGGTCTACACGGGGTAGGTGTGTCCGGTAGTGAATGCCCTGTCAGAAAAAGTG      60
gyrB-VC.con      1 ..M.....Y.....G.....G.....G..T..C..G..Y..T.....
** ***** ** ***** ** ***** ** ***** ** ***** ** *****
gyrB-VM.con      61 CTGCTBACCATTTATCGTGGTGGCAAGATTACACCCAACTTACCATCACGGTGTGCCA      120
gyrB-VC.con      61 ..R..Y.....Y.....Y..Y.....R..C..YW.S.....T.....
** ***** ** ***** ** ***** ** ***** ** ***** ** *****
gyrB-VM.con      121 CAAGCACCGTTGTCTGTGTRGGTGAGACTGAGCGTACCGGTACTACCGTACGTTCTGG      180
gyrB-VC.con      121 .....G.....G.....R.....K..W.....
** ***** ** ***** ** ***** ** ***** ** ***** ** *****
gyrB-VM.con      181 CCTAGTGCACAGACTTTTACCAATATCGAATTCCATTACGACATCTGGCTAAACGYCTG      240
gyrB-VC.con      181 ..W..Y.....R..Y.....Y.....Y.....T.....C...
** ***** ** ***** ** ***** ** ***** ** ***** ** *****
gyrB-VM.con      241 CGTGAGCTGTCAATCCCTGAACCTCTGGCGGTGTCGATCAAGCTGACGGATGAGCGTGAAGAA      300
gyrB-VC.con      241 .....Y.....Y.....Y.....Y.....Y.....Y.....Y.....Y.....
** ***** ** ***** ** ***** ** ***** ** ***** ** *****
gyrB-VM.con      301 GATAAGAAAGACCACCTTYATGTATGAAGGTGGTATTCAAGCGTTTGTKACCCACTTGAAC      360
gyrB-VC.con      301 .....A.....C.....C.....G.....G.....G.....G.....G.....
** ***** ** ***** ** ***** ** ***** ** ***** ** *****
gyrB-VM.con      361 CGTAAYAAACGCCGATCCATGAAAGTATTCCTCACTTCAACCAAGAGCGTGAAGATGGC      420
gyrB-VC.con      361 ..Y.....R.....R.....G.....C.....T.....T.....
** ***** ** ***** ** ***** ** ***** ** ***** ** *****

```

gyrB-VM.con	421	ATCAGCGTGAAGTGGCAATGCAGTGGAAACGATGGTTTCCAAGAAAACATCTACTGCTTT	480
gyrB-VC.con	421R.....Y..... *****	480
gyrB-VM.con	481	ACCAACAACATYCCACAGCGTGATGGCGGTACCCACCTTAGCYGGTTTCCGTTGGTGCRTTG	540
gyrB-VC.con	481	..Y.....C.....T.....Y.....C.....G... ** *****	540
gyrB-VM.con	541	ACCCGTACTTTGAACAACTACATGGACAAAGAGCTTCTCGAAGAAAGCSAAGCRGCA	600
gyrB-VC.con	541Y.....Y..... *****	600
gyrB-VM.con	601	ACCTCGGGTGATGATGCGCGTGAAGCTTAACRGCRCGTGKTKTCGGTGAAAGTRCCRGAT	660
gyrB-VC.con	601G..W..G.. *****	660
gyrB-VM.con	661	CCTAAATCTCRAGCCAAACCAAGATAAGCTRGTTTCTTCGGARGTGAAATCCGCGGTT	720
gyrB-VC.con	661G.....A..A.....R... *****	720
gyrB-VM.con	721	GAGTCAGCCATGAATGAGAAGCTGCGGATTTCTCTGGCGGAAACCCAAAGCGAAGCGAAA	780
gyrB-VC.con	721	..R.....Y.....R.....A..... *****	780
gyrB-VM.con	781	AACGTTTGTTCGAAGATTATTGATGRCRCRGHGTCTCGTGAAGCVGCGGTAAAGCACGT	840
gyrB-VC.con	781Y..K.....S.....C..K *****	840
gyrB-VM.con	841	GAAATGACYCGTCGTAAAGGCGCGCTAGAYYTMGCTGGTTTGCCW	885
gyrB-VC.con	841T..Y.....Y.G..TC.T..W..C..A..C *****	885

 7

rpod-VM.con	1	ACACGTGAAGCGGAAATCGATATATGCCAAGCGCATTTGAAGATGGTATTAACCAAGTTCAA	60
rpod-VC.con	1T.....	60

rpod-VM.con	61	AGTGCGATTGCTGAGTATCCTGGAACCATCCCATACATTCTTGAACAGTTTGACAAAGGTT	120
rpod-VC.con	61T.....TCGT...	120

rpod-VM.con	121	CAGGCAGAAGAACTACGCTGACTGAYCTGATTCTCGTTGATCCTAACGACATG	180
rpod-VC.con	121C.....C.....A.....Y.....	180

rpod-VM.con	181	GAAACCGAAGCGCCAACTGCTACTCAGTTCGTTTCAGARCTCTCTGAAGCCGATCTCGCT	240
rpod-VC.con	181C.....G.....T.....G.....	240

rpod-VM.con	241	GATGAAGATGACGAGGTCGCGGAGGATGAAGACGAGGATGAAGATGAAGACGCGACGGT	300
rpod-VC.con	241T.CT....TC..A.....A.....C.....T.....	300

rpod-VM.con	301	GAAAGYAGCGACAGCGAAGAAGTGGGTATTGACCCCTGAGCTCGCTCGTGAGAAATTC	360
rpod-VC.con	301C.....C.....C.....A..G.....	360

rpod-VM.con	361	AATGAACTGCGCGGCAAGTTCCAAACCTGCAATTAGCGGTAAATGAAATTTGGTCCGTGAC	420
rpod-VC.con	361Y.....	420

7 7 7 3

```

rpod-VM.con      421 AGTAACCAAGCATCTGAAGCTTCAAGCCCTGGTACTGGATATYTTCCGCGGAATTCGCGCCTA 480
rpod-VC.con      421 ...C.T.....T.....G...GA.T.A..GY.....C.....T.....Y... 480
                *** * ***** ***** * * * ***** ***** ***** *
rpod-VM.con      481 ACACCAAAACAATTGACCAATTGGTTGAAACTCTGCGTACCTCGATGGATCGTGTTCGT 540
rpod-VC.con      481 .....G.....C.....C.....C.....C..T..A.....C.....C 540
                ***** ***** ***** ***** * * * ***** *****
rpod-VM.con      541 ACCCAAGAGCGYTTGGTGATGAAGACVGTGGTTGAAGTCGCGGAAATGCCAAAGAAATCA 600
rpod-VC.con      541 .....A..T.....R.....G..A.....G.....G.....G.....G 600
                ***** * * ***** ***** * * ***** *****
rpod-VM.con      601 TTTATGTCYCTRTTTACAGGCAATGAATCGAATGARGAATGGCTYGATAAAGTRCTCGCT 660
rpod-VC.con      601 ..C..C..C..A.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....C..T... 660
                ** ** ** ***** ***** * * ***** ***** * * **
rpod-VM.con      661 TCTGATAARCCCTTATGTACAAAAGTACGTGAGCAAGAAGACGATATTCGCCGCTCAATC 720
rpod-VC.con      661 ....C..G.....C...GCG.....C.....C.....A..G..C.....T.....T 720
                ***** ** ***** * * ***** ***** * * ** *****
rpod-VM.con      721 CAAAACATKCAGATGATCGAACARGAGACTTCACGTCTGTGTGAGCGTATCAAAGACATC 780
rpod-VC.con      721 ..G.....A..A.....G..A.....A.....A.....A..C.....A..... 780
                ** ***** ** ***** * * ***** ***** * * *****
rpod-VM.con      781 AGCCGTCGTATGTCTATCGGGTGAAGCGAAAGCTCGCCGTCGG 822
rpod-VC.con      781 .....A.....A.....G..R.....R.....R.....R..... 822
                ***** ***** ***** * * ***** *****

```

SEQUENCE LISTING

<110> Nichirei Corporation

<120> Primers and probes for detection of vibrio cholera or vibrio mimicus
and method of using thereof

<130> PH-1967-PCT

<140>

<141>

<150> JP 2002/362878

<151> 2002-12-13

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 885

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Consensus sequence of vibrio
cholera and vibrio mimicus -gyrB

<400> 1

gtmtccggyg gtctrcacgg ggtaggtgtg tcggtrgtka aygcsctbtc wgaaaaagtg 60
 ctctbacca tytadcgygg yggcaaraty caywscsaaa cttaccatca ygggtgtgcca 120
 caagcaccgt tgkctgtrgt rggtagakacw gagcgtagcg gtactaccgt acgtttcttg 180
 ccwagygcac aracytttac caatatcgaa ttcattacg acattytggc taaacgyctg 240
 cgtgagctgt cattcctgaa ytctggcgtg tcgatcaagc tgaysgatga rcgtgaagaa 300
 gataaraaag accacttyat gtatgaaggk ggtattcaag cgtttgtkac ccacttgaac 360
 cgyaayaaaa cgccratcca tgaraaagtm ttccacttya accaagagcg tgaagatggc 420
 atcagcgtgg aagtggcrat gcagtgaay gatggtttcc aagaaaacat ctactgcttt 480
 acyaacaaca tyccacagcg tgatggyggt acccayttag cyggtttccg tgggtgcrttg 540
 acccgtagtt tgaacaacta yatggayaaa gaaggcttct cgaagaaagc scaagcrgca 600
 acctcgggtg atgatgcgcg tgaaggctta acrgcdgtkg tdtcggtgaa agtrccrgat 660
 cctaaattct cragccaaac caaagataag ctrgtttctt cggargtraa atccgcrgtt 720
 gartcagcya tgaatgagaa gctggcrgat ttcctrgcgg aaaaccaag cgaagcgaaa 780
 aacgtttgtt cgaagattat tgatgcrgcr cghgckcgtg aagcvgcgcg taaagcmcgk 840
 gaaatgacyc gycgtaaagg cgcgytrgay ythgcwggyt trcch 885

<210> 2

<211> 822

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Consensus sequence of vibrio cholera and vibrio mimicus -rpoD

<400> 2

acacgtgaag gygaaatcga tattgccaaag cgcattgaag atggtattaa ccaagttcaa 60
 agtgcgattg ctgagtatcc tggaaccatc ccwtayattc ttgaracagtt tgaymrkggt 120

caggcmgaag arctacgtct sactgayctg atttcwgggt tcgttgaycc taacgacatg 180
 gaaaccgaag cgccaacygc kactcacatc ggttcwgarc tytctgaagc sgatctcgck 240
 gatgaagatg aygmkgtcgy sgargatgaa gacgargatg aagaygaaga yggcgacggt 300
 gaaagyagcg acagcgaaga agaagtsagg atygacctg arctsgctcg tgagaaattc 360
 aatgaactgc gcggyaagtt ccaaaacctg caattagcgg ttaatgaatt tggctcgtgac 420
 agtmaycaag cwtctgaagc ktcarrcytr gtrytggata tyttccgyga attccgycta 480
 acaccaaarc aattygacca yttggttgaa actctgcgya cytcratgga tcgtgttcgy 540
 acccaagarc gyttggtrat gaaagcvgr gttgaagtcg cgaaratgcc raagaaatcr 600
 ttyatygcyc trtttacagg caatgaatcg aatgargart ggctbgataa agtvctygct 660
 tctgayaarc cttaygtasm raaagtmcgt gagcaagaag amgakatycg ccgytcaaty 720
 caraaactdc aratgatcga rcargagacw tcaactgtctg ttgarcgyat caaagacatc 780
 agccgtcgta tgtcwatcgg tgargcraaa gctcgccgtg cg 822

<210> 3

<211> 822

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Consensus sequence vibrio cholera-*gyrB*

<400> 3

acacgtgaag gygaaatcga tattgccaag cgcattgaag atggtattaa ccaagttcaa 60
 agtgcgattg ctgagtatcc tggaaccatc ccwtayattc ttgarcagtt tgaymrkgtt 120
 caggcmgaag arctacgtct sactgayctg atttcwgggt tcgttgaycc taacgacatg 180
 gaaaccgaag cgccaacygc kactcacatc ggttcwgarc tytctgaagc sgatctcgck 240
 gatgaagatg aygmkgtcgy sgargatgaa gacgargatg aagaygaaga yggcgacggt 300

gaaagyagcg acagcgaaga agaagtsagg atygaccctg arctsgctcg tgagaaattc 360
 aatgaactgc gcggyaagtt ccaaaacctg caattagcgg ttaatgaatt tggtcgtgac 420
 agtmaycaag cwtctgaagc ktcarrcytr gtrytggata tyttccgyga attccgycta 480
 acaccaaarc aattygacca yttgggtgaa actctgcgya cytcratgga tcgtgttcgy 540
 acccaagarc gyttggtrat gaaagcvgr gttgaagtcg cgaaratgcc raagaaatcr 600
 ttyatygcyc trtttacagg caatgaatcg aatgargart ggctbgataa agtvctygct 660
 tctgayaarc cttaygtasm raaagtmcgt gagcaagaag amgakatygc ccgytcaaty 720
 caraaactdc aratgatcga rcargagacw tcaactgtctg ttgarcgyat caaagacatc 780
 agccgtcgta tgtcwatcgg tgargcraaa gctcgccgtg cg 822

<210> 4

<211> 822

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Consensus sequence of vibrio cholera -rpoD

<400> 4

acacgtgaag gtgaaatcga tattgccaaag cgcattgaag atggtattaa ccaagttcaa 60
 agtgcgattg ctgagtatcc tggaaccatc ccttatattc ttgagcagtt tgatcgtggt 120
 caggccgaag agctacgtct cactgacctg atttcagggt tcgttgaycc taacgacatg 180
 gaaaccgaag cgccaaccgc gactcacatc ggttctgagc tttctgaagc ggatctcgcg 240
 gatgaagatg atgctgtcgt cgaagatgaa gacgaagatg aagacgaaga tggcgacggt 300
 gaaagcagcg acagcgaaga agaagtcggt atcgaccctg aactggctcg tgagaaattc 360
 aatgaactgc gcggyaagtt ccaaaacctg caattagcgg ttaatgaatt tggtcgtgac 420
 agtcatcaag cttctgaagc gtcagactta gtgytggata tcttccgtga attccgycta 480
 acaccaaagc aattcgacca cttgggtgaa actctgcgca cttcaatgga tcgtgttcgc 540

acccaagaac gtttggttat gaaagcggta gttgaagtcg cgaagatgcc gaagaaatcg 600
 ttcatcgccc tatttacagg caatgaatcg aatgaagagt ggctggataa agtccttgct 660
 tctgacaagc cttacgtagc gaaagtccgt gagcaagaag aagagatccg ccgttcaatt 720
 cagaaactac aaatgatcga gcaagagaca tcactgtctg ttgaacgcat caaagacatc 780
 agccgtcgta tgtcaatcgg tgaggcraaa gctcgccgtg cg 822

<210> 5

<211> 885

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Consensus sequence of vibrio
mimicus -gyrB

<400> 5

gtctccggtg gtctacacgg ggtaggtgtg tcggtagtga atgccctgtc agaaaaagtg 60
 ctgctbacca tttatcgtgg tggcaagatt cacacccaaa cttaccatca cgggtgtgcca 120
 caagcaccgt tgtctgttgt gggtagagact gagcgtaccg gtactaccgt acgtttcttg 180
 cctagtgcac agactttttac caatatcgaa ttccattacg acattctggc taaacgyctg 240
 cgtgagctgt cattcctgaa ctctggcgtg tcgatcaagc tgacggatga gcgtgaagaa 300
 gataagaaag accacttyat gtatgaaggt ggtattcaag cgtttgtkac ccacttgaac 360
 cgtaayaaaa cgccgatcca tgaaaaagta ttccacttca accaagagcg tgaagatggc 420
 atcagcgtgg aagtggcaat gcagtggaac gatggtttcc aagaaaacat ctactgcttt 480
 accaacaaca tyccacagcg tgatggcggg acccacttag cyggtttccg tgggtgcrttg 540
 accgtactt tgaacaacta catggacaaa gaaggcttct cgaagaaagc scaagcrgca 600
 acctcgggtg atgatgcgcg tgaaggctta acrgcrgtkg tkcgggtgaa agtrccrgat 660
 cctaaattct cragccaaac caaagataag ctrgtttctt cggargtgaa atccgcggtt 720
 gagtcagcca tgaatgagaa gctggcggat ttcttgccgg aaaaccaag cgaagcgaaa 780

aacgtttgtt cgaagattat tgatgcrgr crghgctcgtg aagcvgcgcg taaagcacgt 840
 gaaatgacyc gtcgtaaagg cgcgctagay ytmgctggtt tgccw 885

<210> 6

<211> 822

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: consensus sequence of vibrio
 mimicus -rpoD

<400> 6

acacgtgaag gcgaaatcga tattgccaaag cgcattgaag atggtattaa ccaagttcaa 60
 agtgcgattg ctgagtatcc tggaaccatc ccatacatc ttgaacagtt tgacaagggt 120
 caggcagaag aactacgtct gactgayctg atttctgggt tcgttgatcc taacgacatg 180
 gaaaccgaag cgccaactgc tactcacatc ggttcagarc tctctgaagc cgatctcgct 240
 gatgaagatg acgaggtcgc ggaggatgaa gacgaggatg aagatgaaga cggcgacggt 300
 gaaagyagcg acagcgaaga agaagtgggt attgaccctg agctcgctcg tgagaaattc 360
 aatgaactgc gcggcaagtt ccaaaacctg caattagcgg ttaatgaatt tggtcgtgac 420
 agtaaccaag catctgaagc ttcaagcctg gtactggata tyttccgcga attccgccta 480
 acacccaaaac aatttgacca ttggttgaa actctgcgta cctcgatgga tcgtgttcgt 540
 acccaagagc gyttggtgat gaaagcvgtg gttgaagtcg cgaaaatgcc aaagaaatca 600
 tttattgcyc trtttacagg caatgaatcg aatgargaat ggctygataa agtrctcgct 660
 tctgataarc cttatgtaca aaaagtacgt gagcaagaag acgatattcg ccgctcaatc 720
 caaaaactkc agatgatcga acargagact tcaactgtctg ttgagcgtat caaagacatc 780
 agccgtcgta tgtctatcgg tgaagcgaaa gctcgccgtg cg 822

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/15889

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/31, C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/31, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI/BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS), PubMed, EMBL/Genbank/DDBJ/GenSeq, SwissProt/PIR/GenSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	Yoko NISHIYAMA et al., "rpoD Idenshi Enki Hairetsu ni yoru Bunshi Keito Kaiseki ni Motoduita Vibrio vulnificus Tokui Kenshutsu PCR Primer no Sekkei", Dai 23 Kai Japanese Society of Food Microbiology Gakujutsu Sokai Koen Yoshishu, 24 September, 2002 (24.09.02), page 42	7-12, 21-26, 35-40/ 1-6, 13-20, 27-34, 41-42
Y	Yuji KOIZUMI et al., "rpoD Idenshi Hairetsu ni yoru Bunshi Keitou Kaiseki ni Motoduita Choen Vibrio Tokui Kenshutsu PCR Primer no Sekkei", Dai 22 Kai Japanese Society of Food Microbiology Gakujutsu Sokai Koen Yoshishu, 18 October, 2001 (18.10.01), page 36	1-6, 13-20, 27-34, 41-42

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
13 January, 2004 (13.01.04)

Date of mailing of the international search report
27 January, 2004 (27.01.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/15889

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Vuddhakul V. et al., Analysis of gyrB and toxR gene sequence of Vibrio hollisae and development of gyrB-and toxR-targeted PCR methods for isolation of V., hollisae from the environment and its identification., Applied and Environmental Microbiology, February, 2000, Vol.66, No.8, pages 3506 to 3514	1-6,13-20, 27-34,41-42
Y	Venkateswaran K., et al., Cloning and nucleotide sequence of the gyrB gene of Vibrio Parahaemolyticus and its application in detection of this pathogen in shrimp., Applied and Environmental Microbiology, February, 1998, Vol.64, No.2, pages 681 to 687	1-6,13-20, 27-34,41-42
Y	WO 97/35970 A1 (NIPPON SUISAN KAISHA, LTD.), 02 October, 1997 (02.10.97), & EP 965636 A1 & JP 09-252783 A & US 6048697 A & CA 2249183 A	1-6,13-20, 27-34,41-42
Y	YAMAMOTO S., et al., Phylogenetic structures of the genus Acinetobacter based on gyrB sequences: comparison with the grouping by DNA-DNA hybridization., Int.J.Syst.Bacteriol.January, 1999, Vol.49, pages 87 to 95	1-42
Y	JP 08-256798 A (Marine Biotechnology Institute Co., Ltd.), 08 October, 1996 (08.10.96), (Family: none)	1-42
Y	JP 07-213299 A (Marine Biotechnology Institute Co., Ltd.), 15 August, 1995 (15.08.95), (Family: none)	1-42
Y	Heidelberg JF. et al., DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen Vibrio cholerae., Nature, August, 2000, Vol.406, pages 477 to 483	1-42
A	JP 05-276996 A (Toyobo Co., Ltd.), 26 October, 1993 (26.10.93), (Family: none)	1-42
P,A	WO 03/014393 A1 (NICHIREI CORP.), 20 February, 2003 (20.02.03), & JP 2003-047474 A	1-42

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/31, C12Q1/68

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/31, C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI/BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS), PubMed
EMBL/Genbank/DDBJ/GenSeq, SwissProt/PIR/GenSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y	西山葉子他, <i>rpoD</i> 遺伝子塩基配列による分子系統解析に基づいた <i>Vibrio vulnificus</i> 特異検出 PCR プライマーの設計, 第 23 回日本食品微生物学会学術総会講演要旨集, 2002.09.24, 第 42 頁	7-12, 21-26, 35-40 / 1-6, 13-20, 27-34, 41-42
Y	小泉雄史他, <i>rpoD</i> 遺伝子配列による分子系統解析に基づいた腸炎ビブリオ特異検出 PCR プライマーの設計, 第 22 回日本食品微生物学会学術総会講演要旨集, 2001.10.18, 第 36 頁	1-6, 13-20, 27-34, 41-42

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

13. 01. 2004

国際調査報告の発送日

27. 1. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

北村 弘樹

印

4B

9349

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Vuddhakul V, et al. Analysis of <i>gyrB</i> and <i>toxR</i> gene sequence of <i>Vibrio hollisae</i> and development of <i>gyrB</i> - and <i>toxR</i> -targeted PCR methods for isolation of <i>V. hollisae</i> from the environment and its identification. Applied and Environmental Microbiology, February 2000, Vol.66, No.8, p.3506-3514	1-6, 13-20, 27-34, 41-42
Y	Venkateswaran K, et al. Cloning and nucleotide sequence of the <i>gyrB</i> gene of <i>Vibrio Parahaemolyticus</i> and its application in detection of this pathogen in shrimp. Applied and Environmental Microbiology, February 1998, Vol.64, No.2, p.681-687	1-6, 13-20, 27-34, 41-42
Y	WO 97/35970 A1 (NIPPON SUISAN KAISHA, LTD.) 1997. 10. 02 & EP 965636 A1 & JP 09-252783 A & US 6048697 A & CA 2249183 A	1-6, 13-20, 27-34, 41-42
Y	Yamamoto S, et al. Phylogenetic structures of the genus <i>Acinetobacter</i> based on <i>gyrB</i> sequences: comparison with the grouping by DNA-DNA hybridization. Int. J. Syst. Bacteriol. January 1999, Vol.49, p.87-95	1-42
Y	JP 08-256798 A (株式会社海洋バイオテクノロジー研究所) 1996. 10. 08 (ファミリーなし)	1-42
Y	JP 07-213299 A (株式会社海洋バイオテクノロジー研究所) 1995. 08. 15 (ファミリーなし)	1-42
Y	Heidelberg JF, et al. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen <i>Vibrio cholerae</i> . Nature, August 2000, Vol.406, p.477-483	1-42
A	JP 05-276996 A (東洋紡績株式会社) 1993. 10. 26 (ファミリーなし)	1-42
P, A	WO 03/014393 A1 (NICHIREI CORPORATION) 2003. 02. 20 & JP 2003-047474 A	1-42